

**EFEK PREVENTIF KEFIR SUSU KUDA SUMBAWA
TERHADAP KARIES GIGI YANG DIINDUKSI
Streptococcus mutans BERDASARKAN PRODUKSI
TNF- α – Gr1 DAN IL-10 – TCD₄ PADA
HEWAN COBA MENCIT
(*Mus musculus*)**

SKRIPSI

Oleh:
NISA TAZKIYAH
125130100111010



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**EFEK PREVENTIF KEFIR SUSU KUDA SUMBAWA
TERHADAP KARIES GIGI YANG DIINDUKSI
Streptococcus mutans BERDASARKAN PRODUKSI
TNF- α – Gr1 DAN IL-10 – TCD₄ PADA
HEWAN COBA MENCIT
(*Mus musculus*)**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:
NISA TAZKIYAH
125130100111010



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Efek Preventif Kefir Susu Kuda Sumbawa Terhadap Karies Gigi
yang Diinduksi *Streptococcus mutans* Berdasarkan Produksi
TNF- α – Gr1 dan IL-10 – TCD₄ pada Hewan Coba
Mencit (*Mus musculus*)**

Oleh:
NISA TAZKIYAH
125130100111010

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 7 Agustus 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II


Dr. Sri Murwani, drh., MP.
NIP. 19630101 198903 2 001


drh. Fajar Shodiq Permata, M. Biotech
NIP. 19870501 201504 1 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya


Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nisa Tazkiyah

NIM : 125130100111010

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

Efek Preventif Kefir Susu Kuda Sumbawa Terhadap Karies Gigi yang Diinduksi *Streptococcus mutans* Berdasarkan Produksi TNF- α – Gr1 dan IL-10 – TCD₄ pada Hewan Coba Mencit (*Mus musculus*)

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang tercantum di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 7 Agustus 2018
Yang menyatakan,

(Nisa Tazkiyah)
NIM. 125130100111010

**Efek Preventif Kefir Susu Kuda Sumbawa Terhadap Karies Gigi yang
Diinduksi *Streptococcus mutans* Berdasarkan Produksi TNF- α - Gr1
dan IL-10 – TCD₄ pada Hewan Coba Mencit (*Mus musculus*)**

ABSTRAK

Karies gigi merupakan penyakit infeksi yang menyebabkan kerusakan jaringan gigi hingga terbentuk kavitas dan sering terjadi pada anjing. Penyebab utama karies gigi adalah *Streptococcus mutans* yang menyebabkan fermentasi karbohidrat, mengubah pH mulut menjadi asam, demineralisasi gigi, membentuk biofilm, dan bersifat immunosupresan. Kondisi pH mulut juga akan menurun drastis apabila diberi pakan diet kariogenik seperti sukrosa. Kefir susu kuda Sumbawa memiliki efek immunostimulator, kandungan antibakteri dan mineral untuk remineralisasi gigi. Tujuan penelitian ini adalah untuk menguji kemampuan kefir susu kuda Sumbawa dalam mencegah karies gigi terhadap produksi TNF- α – Gr1 dan IL-10 – TCD₄ pada hewan coba yang diinduksi *S. mutans*. Penelitian ini eksperimental dengan metode *post-test only control design* menggunakan model Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba yang digunakan adalah mencit Balb/c jantan, berat badan \pm 20-30 gram, dan umur 1,5 bulan dengan jumlah sampel 20 ekor yang diberikan Ampicilin selama 3 hari untuk menekan pertumbuhan bakteri oral sebelum perlakuan, kemudian dibagi menjadi: kelompok K(-) sebagai kelompok kontrol negatif, kelompok K(+) sebagai kelompok model karies gigi yang diinduksi bakteri *S. mutans* 4×10^9 CFU/ekor setiap hari selama 5 hari dan diet sukrosa 5%, kelompok P1, P2, dan P3 sebagai kelompok preventif dengan masing-masing pemberian kefir susu kuda Sumbawa dosis 0,1 ml/ekor, 0,25 ml/ekor, dan 0,5 ml/ekor setiap hari selama 14 hari yang diberikan sebelum diinduksi *S. mutans* dan diet sukrosa 5%. Parameter yang diukur adalah produksi TNF- α – Gr1 dan IL-10 – TCD₄ dari glandula saliva menggunakan metode *flowcytometry*. Data yang diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan metode *One-Way ANOVA* dengan $\alpha=0,05$. Hasil penelitian menunjukkan peningkatan produksi TNF- α – Gr1 dan penurunan produksi IL-10 – TCD₄ secara optimal pada dosis 0,5 ml/ekor dengan signifikansi $p<0,05$. Kesimpulan dari penelitian ini adalah kefir susu kuda Sumbawa memiliki efek preventif untuk karies gigi.

Kata kunci : Karies gigi, Kefir susu kuda Sumbawa, *Streptococcus mutans*, TNF- α - Gr1, IL-10 – TCD₄

Preventive Effect Of Sumbawa's Horse Milk Kefir on Tooth-Induced Dental Caries *Streptococcus mutans* Based on TNF- α - Gr1 and IL-10 – TCD₄ Production with Mice (*Mus musculus*) as Experimental Animals

ABSTRACT

Dental caries is an infectious disease that causes damage on tooth tissue to form cavitation and often occurs in dogs. The main cause of dental caries is *Streptococcus mutans* which causes carbohydrate fermentation, turning the pH of the mouth into acid, dental demineralization, forming biofilms, and immunosuppressant. Oral pH conditions will also decrease drastically when fed by a cariogenic diet such as sucrose. Sumbawa's Horse Milk Kefir has immunostimulator effects, antibacterial and mineral contents for tooth remineralization. The objective of this study was to test the ability of Sumbawa's Horse Milk Kefir in preventing dental caries against TNF- α – Gr1 and IL-10 – TCD₄ production in *S. mutans*-induced susceptible animals. This research was experimental using completely Randomized Complete Design (RAL) model. The experimental animals use male Balb/c mice, weight \pm 20-30 grams, and 1.5 months of age with 20 samples given by Ampicilin for 3 days to suppress the growth of oral bacteria prior to treatment, then divided into: K group (-) as a negative control group, group K (+) as a group of induced dental caries model of *S. mutans* 4×10^9 CFU/mice every day for 5 days and 5% sucrose diet, P1, P2 and P3 groups as group preventive treatment with each giving Sumbawa's Horse Milk Kefir dose 0.1 ml / mice, 0.25 ml / mice, and 0.5 ml / mice every day for 14 days given before induced *S. mutans* and 5% sucrose diet. The parameters measured are the production of TNF- α – Gr1 and IL-10 – TCD₄ from salivary glands using *flowcytometry* method. The data obtained analyzed statistically using *One-Way* ANOVA method with $\alpha=0,05$. The results showed elevated levels of TNF- α – Gr1 and decreased IL-10 – TCD₄ levels with optimal effect at dose of 0.5 ml/mice with a significance $p<0.05$. The conclusion of this study is that Sumbawa's Horse Milk Kefir has a preventive effect on dental caries.

Keywords: Dental caries, Sumbawa's horse milk kefir, *Streptococcus mutans*, TNF- α , IL-10

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberikan petunjuk dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“Efek Preventif Kefir Susu Kuda Sumbawa Terhadap Karies Gigi yang Diinduksi *Streptococcus mutans* Berdasarkan Produksi TNF- α - Gr1 dan IL-10 – TCD₄ pada Hewan Coba Mencit (*Mus musculus*)”**. Penelitian ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya. Dengan tersusunnya skripsi ini, penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada:

1. Dr. Sri Murwani, drh., MP. selaku dosen pembimbing 1 dan drh. Fajar Shodiq Permata, M. Biotech selaku dosen pembimbing 2 yang telah memberikan ilmu, fasilitas dan waktu, bantuannya yang dengan sabar membimbing untuk bisa menulis dengan baik, serta senantiasa memberi semangat sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
2. drh. Fidi Nur Aini E.P.D., M.Si selaku doseng penguji 1 dan drh. Galuh Chandra Agustina, M.Si selaku dosen penguji 2 yang telah memberikan tanggapan, saran dan arahan serta waktunya untuk perbaikan skripsi.
3. Keluarga tercinta (alm) ayahanda Dr. Ir. Zulkifli, MP., ibunda Dr. Ir. Maleha, MS., kakak dr. Restu Hijriah dan adik Annas Ma'ruf atas segala doa, semangat, pengertian dan kasih sayangnya.
4. Prof. Muhaimin Rifa'i, PhD. Med. Sc., Mas Bambang, serta asisten Laboratorium Fisiologi Hewan FMIPA Universitas Brawijaya, Mas Slamet

dan seluruh staf Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, juga Drh. Dahliatul Qosimah, M.Kes dan asisten Laboratorium Mikrobiologi FKH, Universitas Brawijaya yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian.

5. Prof. Dr. Pratiwi Trisunuwati, drh., MS., yang telah membantu membimbing dan memotivasi saya untuk segera menyelesaikan studi.
6. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES., selaku dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
7. Teman seperjuangan PHK PMA "Kuda Juara" Intan Purnam Sari dan Yessie Sekti Putri Pratiwi yang sudah melewati suka dan duka bersama selama penelitian sampai selesainya studi.
8. Teman-temanku "Gengges" Amelda, Febby, Mulam, Alifatul, Siska, dan Markzy yang telah memberikan konsultasi, saran, masukan, dan semangatnya.
9. Teman-teman 2012 kelas A "Vena'12" yang selalu memberikan keceriaan dan dorongan semangatnya.
10. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan semoga skripsi ini dapat bermanfaat serta menambah pengetahuan bagi penulis maupun pembaca.

Malang, 7 Agustus 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.5 Batasan Masalah	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Karies Gigi	7
2.1.1 Patofisiologi	8
2.1.2 Patologi Anatomi	10
2.1.3 Diagnosa	12
2.1.4 Pencegahan	13
2.1.5 Pengobatan	14
2.1 <i>Streptococcus mutans</i>	15
2.2.1 Morfologi dan Klasifikasi	15
2.2.2 Faktor Virulensi	16
2.2.3 Hubungan dengan Karies Gigi	18
2.3 Kefir Susu Kuda Sumbawa	20
2.3.1 Susu Kuda Sumbawa	20
2.3.2 Kefir	23
2.4 Respon Imun Oral (Sitokin)	27
2.4.1 <i>Tumor Necrosis Alpha</i> (TNF- α)	28
2.4.2 Interleukin 10	28
2.4.3 Imunostimulator	29
2.5 Glandula Saliva	30
2.6 Hewan Coba Mencit (<i>Mus musculus</i>)	31
BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konseptual	34
3.2 Hipotesis Penelitian	37

BAB 4. METODOLOGI PENELITIAN	
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	38
4.2 Alat dan Bahan.....	38
4.3 Sampel Penelitian	39
4.3.1 Penetapan Dosis Kefir Susu Kuda Sumbawa	40
4.4 Rancangan Penelitian.....	40
4.5 Variabel Penelitian.....	42
4.6 Tahapan Penelitian.....	42
4.6.1 Persiapan Hewan Coba	42
4.6.2 Pembuatan Kefir Susu Kuda Sumbawa	43
4.6.3 Pembuatan Suspensi Bakteri <i>Streptococcus mutans</i>	43
4.6.4 Isolasi Glandula Saliva	44
4.6.5 Deteksi Produksi TNF- α dan IL-10 dengan Analisis FACS	45
4.6.6 Analisa Data.....	46
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	
5.1 Gambaran Gigi Mencit yang Diinfeksi <i>Streptococcus mutans</i>	47
5.2 Efek Pemberian Kefir Susu Kuda Sumbawa Terhadap Produksi TNF- α	48
5.3 Efek Pemberian Kefir Susu Kuda Sumbawa Terhadap Produksi IL-10	53
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN	
6.1 Kesimpulan	59
6.2 Saran	59
DAFTAR PUSTAKA	60
LAMPIRAN	66

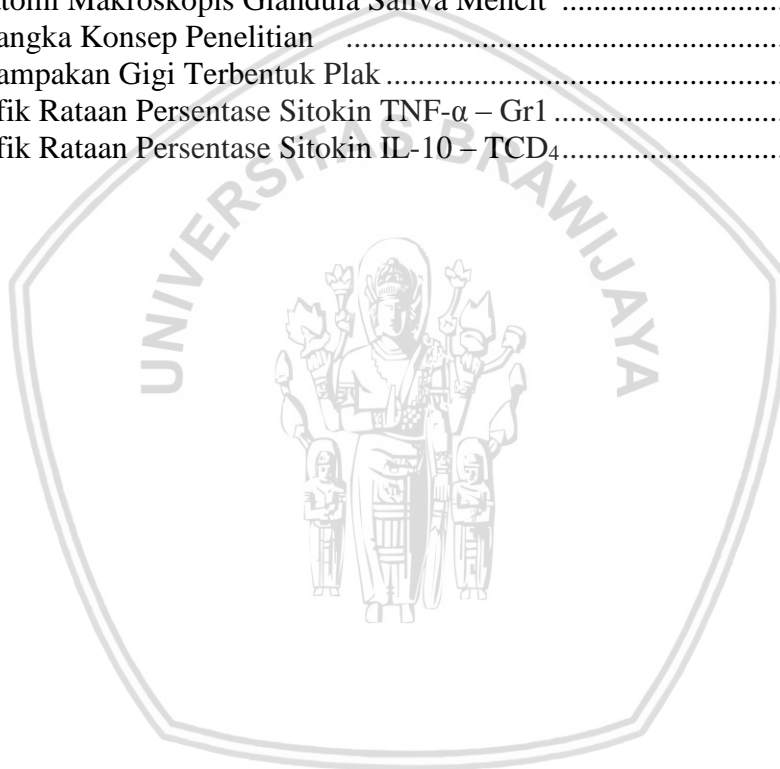
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Aktivitas Antimikroba Susu Kuda Sumbawa, Susu Kuda Bukan Sumbawa dan Susu Sapi	23
2.2 Uji Sensitivitas Antimikroba Terhadap Berbagai Bakteri Patogen dan Perusak Pangan	23
4.1 Rancangan Penelitian	41
5.2 Hasil Perbandingan Produksi TNF- α – Gr1 Antar Kelompok Perlakuan . .	49
5.3 Hasil Perbandingan Produksi IL-10 – TCD ₄ Antar Kelompok Perlakuan ..	55



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Struktur Gigi Anjing	10
2.2 Ketebalan dan Warna Karies Gigi Anjing	11
2.3 Skoring Karies Gigi pada Anjing	12
2.4 Menyikat Gigi Anjing oleh Pemilik	13
2.5 Proses Pemasangan Pit dan Fissure Sealant	14
2.6 Morfologi <i>Streptococcus mutans</i>	16
2.7 Anatomi Kelenjar Ludah pada Anjing	31
2.8 Mencit strain Balb/c Jantan	33
2.9 Anatomi Makroskopis Glandula Saliva Mencit	33
3.1 Kerangka Konsep Penelitian	34
5.1 Penampakan Gigi Terbentuk Plak	47
5.2 Grafik Rataan Persentase Sitokin TNF- α – Gr1	48
5.3 Grafik Rataan Persentase Sitokin IL-10 – TCD ₄	54



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Surat Keterangan Mencit dari Unit Pra-Klinik LPPT UGM	67
2. Sertifikat Laik Etik	68
3. Surat Keterangan <i>Streptococcus mutans</i> dari FKG UNAIR	69
4. Skema Tahapan Penelitian	70
5. Perhitungan Dosis Kefir Susu Kuda Sumbawa	71
6. Diagram Alir Uji <i>Flowcytometry</i>	72
7. Hasil Uji Bakteri Asam Laktat dan TPC Kefir Susu Kuda Sumbawa	73
8. Dokumentasi Penelitian	74
9. Hasil Uji <i>Flowcytometry</i>	75
10. Hasil Analisa Statistika	80



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

<u>Simbol/ singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
ANOVA	<i>Analysis of variant</i>
BHIA	<i>Brain Heart Infusion Agar</i>
BHIB	<i>Brain Heart Infusion Broth</i>
BNJ	Beda Nyata Jujur
Ca	Kalsium
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
EP	<i>Extracellular Product</i>
EPS	<i>Extracellular Polymeric Substances</i>
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
Gr-1	Granulosit-1
GTFs	<i>Glukosiltransferase</i>
IL-10	<i>Interleukin-10</i>
ml	Mililiter
OD	<i>Optical Density</i>
P	Phospor
PBS	<i>Phosphat Buffer Saline</i>
RAL	Rancangan acak lengkap
T CD ₄	Sel Th 2 substitusi CD ₄ ⁺
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
TYC	<i>Tryptone Yeast Cysteine</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kesehatan gigi merupakan hal yang sangat penting untuk diperhatikan bukan hanya pada manusia, melainkan juga pada hewan kesayangan seperti anjing. Dimana kesehatan gigi dapat mempengaruhi nilai estetika dan ekonomi. Gigi yang berada dalam kavum oral merupakan alat prehensi utama dalam mengolah makanan pada sistem pencernaan, yang rentan terhadap berbagai macam sumber penyakit seperti bakteri, virus, ataupun jamur. Penyebab utama penyakit gigi adalah plak, yang menyebabkan karies maupun radang periodonsium (Zaenab dkk., 2004). Hasil survey dari United States, hanya 7% dari total populasi anjing yang dinyatakan sehat pada kavum oral (Lund *et al.*, 1999). Adapun hasil penelitian lainnya mengatakan bahwa, karies gigi merupakan prevalensi penyakit mulut tertinggi yaitu 61,3% dari total 408 ekor anjing (Kyllar *and* Witter, 2005), dan 5,25% anjing dewasa memiliki satu atau lebih lesi karies (Hale, 2004).

Karies gigi atau karang gigi adalah kerusakan jaringan/ struktur gigi kronis akibat suatu masa yang mengalami kalsifikasi yang terbentuk dan melekat erat pada permukaan gigi dan objek solid lainnya di dalam mulut oleh bakteri patogen spesifik (Colin, 2006). Penyebab karies gigi yang utama adalah bakteri *Streptococcus mutans*, selain itu dengan adanya penambahan diet karbohidrat sukrosa yang merupakan gula paling kariogenik mampu membentuk EPS atau biofilm untuk membantu bakteri melekat pada permukaan gigi (Zaenabk dkk.,

2004; Forssten *et al.*, 2010). Apabila karies gigi dibiarkan terus-menerus tanpa adanya penanganan maka melalui lubang karies, *S. mutans* dapat masuk ke dalam tubuh yang bisa menyebabkan *rheumatic fever* pada otot jantung (Artaria, 2009).

Sampai saat ini, penanganan karies gigi pada anjing yang ditawarkan dalam dunia kedokteran hewan adalah *scalling* (pembersihan lesi karies), restorasi gigi (penambalan), atau ekstraksi gigi (pencabutan) (Hamilton *et al.*, 2014; Holmstrom *et al.*, 2013). Salah satu tindakan pencegahan yang umum dilakukan adalah terapi fluoride, tetapi apabila dosis yang digunakan tidak tepat dapat menyebabkan kelainan gigi (*dental fluorosis*) atau gejala keracunan (Djamil, 2011). Untuk itu, diperlukan tindakan pencegahan karies gigi yang lebih efektif dan mudah dalam aplikasi.

Kelenjar saliva memiliki peranan yang penting dalam mempertahankan kesehatan jaringan mulut. Hipofungsi kelenjar saliva dapat menyebabkan efek samping seperti karies gigi, kesulitan menelan, dan candidiasis (Ono *et al.*, 2015). Saliva yang merupakan cairan biologis disekresikan ke dalam rongga mulut oleh kelenjar saliva, menurunnya pH saliva (asam) dan jumlah saliva yang kurang menunjukkan resiko terjadinya karies yang tinggi (Tamin dan Yassi, 2010). Selain itu saliva juga berkaitan dengan sistem imun tubuh. Leukosit yang berfungsi sebagai antimikroba dalam saliva 98% adalah neutrofil dengan marker Gr-1 yang akan mengekspresikan TNF- α . Aktivasi makrofag dapat terjadi apabila sel T limfosit terstimulasi dan dipresentasikan dalam konteks MHC-II ke sel CD4⁺, dimana dalam keadaan yang berbeda dapat membentuk dua subset yang berlawanan, Th1 dan Th2. Sekresi sitokin yang dihasilkan oleh Th1 dan Th2

berbeda. Th2 dengan marker TCD₄, dan beberapa subset sel dendritik akan memproduksi IL-10 yang berdasarkan hasil studi yang telah dilakukan, IL-10 diidentifikasi sebagai sitokin yang menghambat produksi sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α (Abbas *et al.*, 2014; Cogulu *et al.*, 2015; Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).

Susu adalah salah satu hasil produk hewani yang diketahui dapat mengurangi angka kejadian karies gigi (WHO, 2009). Susu kuda Sumbawa lebih mudah dicerna dalam tubuh karena memiliki kasein yang lebih rendah dibandingkan susu sapi, domba dan kambing. Selain itu, susu kuda Sumbawa juga mempunyai aktivitas antimikroba dengan spektrum luas yang tidak dapat ditemukan pada susu kuda bukan Sumbawa maupun susu sapi (Hermawati, 2004). Kefir adalah minuman fermentasi yang memiliki kemampuan probiotik sebagai tindakan pencegahan atau terapi penyakit oral. Asam laktat yang dihasilkan oleh kefir saat proses fermentasi dapat menghambat bakteri pathogen dan menstimulasi respon imun hospes (Suhartanti dan Iqbal, 2014). Dibandingkan susu kuda yang tidak diberi kefir, kefir susu kuda Sumbawa memiliki penyerapan yang lebih baik dalam tubuh.

Berdasarkan fenomena tersebut, dapat terlihat adanya potensi yang besar dalam memanfaatkan kefir susu kuda Sumbawa sebagai tindakan pencegahan karies gigi pada anjing. Oleh karena itu, perlu dilakukan uji preventif kefir susu kuda Sumbawa untuk membuktikan adanya efek immunostimulator terhadap produksi TNF- α – Gr1 dan IL-10 – TCD₄ yang diinduksi *Streptococcus mutans* pada hewan coba mencit (*Mus musculus*) strain balb/c.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas, maka rumusan masalah penelitian ini, antara lain:

1. Apakah kefir susu kuda Sumbawa berpotensi menghambat terjadinya karies gigi dengan meningkatkan produksi $\text{TNF-}\alpha$ - Gr1 yang diinduksi *Streptococcus mutans*?
2. Apakah kefir susu kuda Sumbawa berpotensi menghambat terjadinya karies gigi dengan menurunkan produksi IL-10 - TCD_4 yang diinduksi *Streptococcus mutans*?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas, maka tujuan penelitian ini, antara lain:

1. Mengetahui efek preventif karies gigi dengan pemberian kefir susu kuda Sumbawa terhadap peningkatan produksi $\text{TNF-}\alpha$ - Gr1 yang diinduksi *Streptococcus mutans*.
2. Mengetahui efek preventif karies gigi dengan pemberian kefir susu kuda Sumbawa terhadap penurunan produksi IL-10 - TCD_4 yang diinduksi *Streptococcus mutans*.

1.4 Manfaat Penelitian

Adapun beberapa manfaat yang diharapkan dalam penelitian ini, yaitu:

1. Dapat memberikan informasi tentang efek preventif pemberian kefir susu kuda Sumbawa berdasarkan perubahan produksi TNF- α - Gr1 dan IL-10 - TCD₄ yang diinduksi *Streptococcus mutans* sehingga dapat menjadi acuan bagi penelitian selanjutnya.
2. Pemanfaatan hasil potensi daerah untuk obat tradisional yang berpotensi sebagai immunostimulator pada hewan diinduksi *Streptococcus mutans* sehingga dapat mengurangi kerugian ekonomis dan mengurangi angka kejadian penyakit karies gigi.

1.5 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka batasan masalah dalam penelitian ini meliputi:

1. Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) strain balb/c jantan berumur 1,5 bulan dengan bobot badan 20-30 gram (Berata, 2009). Mencit diperoleh dari Unit Pra-Klinik LPPT Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta (Lampiran 1), dan telah mendapatkan sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No: 423-KEP-UB (Lampiran 2).
2. Susu kuda Sumbawa diperoleh langsung dari Sumbawa dalam bentuk kemasan menggunakan jasa pengiriman, dan dibuat kefir di Laboratorium Mikrobiologi FKH UB (Safitri dan Swarastuti, 2013).

3. Dosis kefir susu kuda Sumbawa yang digunakan adalah 0,1 ml, 0,25 ml, dan 0,5 ml mengacu pada penelitian Ghasempour *et al.* (2014) dimana tiap 1 ml kefir susu kuda Sumbawa mengandung total BAL sebanyak $1,9 \times 10^6$ CFU (Lampiran 5 dan 7).
4. Penelitian ini menggunakan bakteri *Streptococcus mutans* yang diambil dari stok bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Surabaya (Lampiran 3).
5. Suspensi bakteri *S. mutans* yang digunakan pada mencit adalah 4×10^9 CFU (Rocha *et al.*, 2009).
6. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah produksi TNF- α ditandai dari Gr-1 dan IL-10 yang dilabel dari sel TCD₄ dari isolasi glandula saliva (Takei *et al.*, 1994), yang diukur menggunakan metode *flowcytometry*.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Karies Gigi

Karies gigi merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh demineralisasi email dan dentin yang erat hubungannya dengan konsumsi makanan yang kariogenik (tinggi karbohidrat, lengket, dan mudah hancur di dalam mulut). Terjadinya karies gigi juga diakibatkan peran dari bakteri pada golongan *Streptokokus* mulut yang secara kolektif disebut *Streptococcus mutans*. Karies gigi bersama dengan saliva akan menghasilkan iritasi mekanik dan gangguan pengunyahan sehingga hewan kesulitan makan dan menjadi gelisah. Kondisi selanjutnya dapat menyebabkan penyakit periodontal, seperti gingivitis dan periodontitis. (Worotijan dkk., 2013).

. Kesehatan gigi pada hewan kesayangan saat ini mulai menjadi trend atau budaya di kalangan pecinta hewan. Keberadaan karies gigi dapat mempengaruhi status kesehatan anjing maupun kucing. Menurut Utama dkk., (2017) terdapat beberapa faktor yang dapat menentukan timbulnya plak gigi yang diikuti dengan karang gigi dan penyakit periodontal, antara lain: umur dan status kesehatan, diet dan kebiasaan mengunyah, ras hewan, genetik, dan bentuk susunan gigi, keadaan mulut, serta cara perawatan dan *grooming*. Dilihat dari umur, semakin tua maka memiliki karies gigi dengan warna lebih gelap dan tebal. Dibandingkan dengan kucing, umumnya kasus karies gigi lebih sering ditemukan di klinik terjadi pada anjing, hal ini dikarenakan kucing memiliki kebiasaan *auto-grooming*. Selain faktor umur dan kebiasaan (*habit*), makanan yang umum

dikonsumsi oleh anjing juga dapat mempengaruhi tingkat kejadian karies gigi. Meskipun anjing merupakan hewan karnivora, tapi banyak kasus yang ditemukan bahwa *owner* (pemilik) anjing memberikan pakan tidak hanya daging tetapi *dog food* yang teksturnya renyah, mudah dihancurkan (lembek), kering, keras dan juga ada yang empuk (Pello dkk., 2015). Adapun faktor lainnya yang menyebabkan angka karies gigi pada anjing lebih tinggi dibandingkan hewan peliharaan lainnya seperti kucing, dikarenakan anatomi gigi anjing sebanyak 42 gigi, dengan kerapatan antar gigi ini memungkinkan terjadinya penumpukan plak dan perlekatan makanan yang menjadi sumber bakteri untuk tumbuh. Adapun predileksi karies gigi pada anjing sering ditemukan pada gigi premolar IV, molar I, molar II, caninus, dan maksila (rahang atas) (Kusumawati dkk., 2014).

2.1.1 Patofisiologi

Proses terjadinya karies gigi disebabkan oleh adanya interaksi antara gigi, bakteri, dan gula. Adanya mikroflora mulut dalam bentuk plak merupakan syarat utama terbentuknya karies. Diantara mikroflora dalam mulut, *Streptococcus mutans* merupakan organisme kariogenik yang paling efisien dalam menyebabkan karies gigi (Nasution, 2006).

Dimulai dengan adanya plak pada permukaan gigi, sukrosa dari sisa makanan dan mikroorganisme pada gigi dalam jangka waktu tertentu akan menyebabkan timbulnya asam yang akan menurunkan pH mulut menjadi kritis (< 5,5), dan hal ini akan menyebabkan terjadinya demineralisasi email dan akan berlanjut menjadi karies gigi. Awal terjadinya karies gigi terlihat adanya lesi karies berwarna putih sebagai akibat dekalsifikasi, kemudian lesi karies akan

berkembang menjadi lubang berwarna coklat atau hitam yang mengikis gigi (Rosidi dkk., 2013).

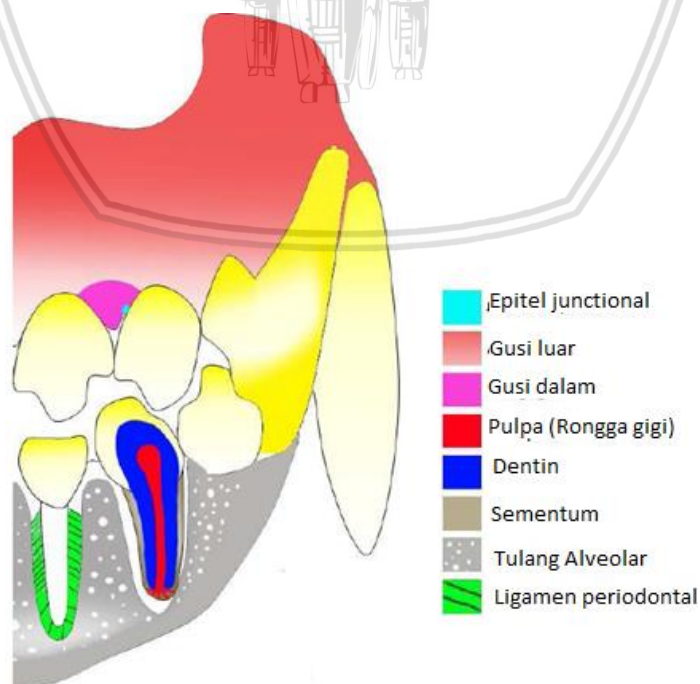
Plak adalah suatu lapisan lunak yang terdiri atas kumpulan mikroorganisme yang berkembang biak di atas suatu matriks yang terbentuk dan melekat erat pada permukaan gigi yang tidak dibersihkan. *Streptococcus mutans* diakui sebagai bakteri utama penyebab karies, karena bakteri ini bersifat asidogenik dan asidurik (Nasution, 2006). *Streptococcus mutans* mempunyai kemampuan untuk mengambil molekul gula sederhana dan membentuknya menjadi polymer panjang. Gula yang sudah terpolimerasi ini menempel pada gigi. Gula sederhana bisa tercuci oleh saliva tetapi bila sudah terpolimerisasi tidak bisa dicuci. Bakteri ini melakukannya agar bisa bertahan hidup dengan cara menempel pada gula terpolimerisasi yang menempel pada gigi tersebut, kemudian menggerogoti mahkota gigi. Plak juga berperan membantu agar gula terpolimerisasi menempel pada gigi (Artaria, 2009).

Kecepatan pembentukan plak tergantung dari konsistensi, macam, dan keras lunaknya makanan. Makanan lunak tidak memerlukan pengunyahan yang banyak, sehingga sedikit atau tidak sama sekali memberikan efek pembersihan pada gigi. Jika diet makanan dari sukrosa, plak akan menebal dan melekat. Hal ini disebabkan terbentuknya polisakarida ekstraseluler (dekstran) yang lebih banyak dihasilkan dari pemecahan sukrosa. Dengan bantuan *Streptococcus mutans*, sukrosa akan membentuk dekstran dan levan. Dekstran adalah prekursor plak gigi, sebagai mediator kolonisasi dan agregasi kuman asidogenik, serta tahan terhadap dekstruksi mikroorganisme. Sehingga disimpulkan, makanan dan minuman yang

mengandung gula akan menurunkan pH plak dengan cepat sampai pada level yang menyebabkan demineralisasi email dan dentin (Nasution, 2006).

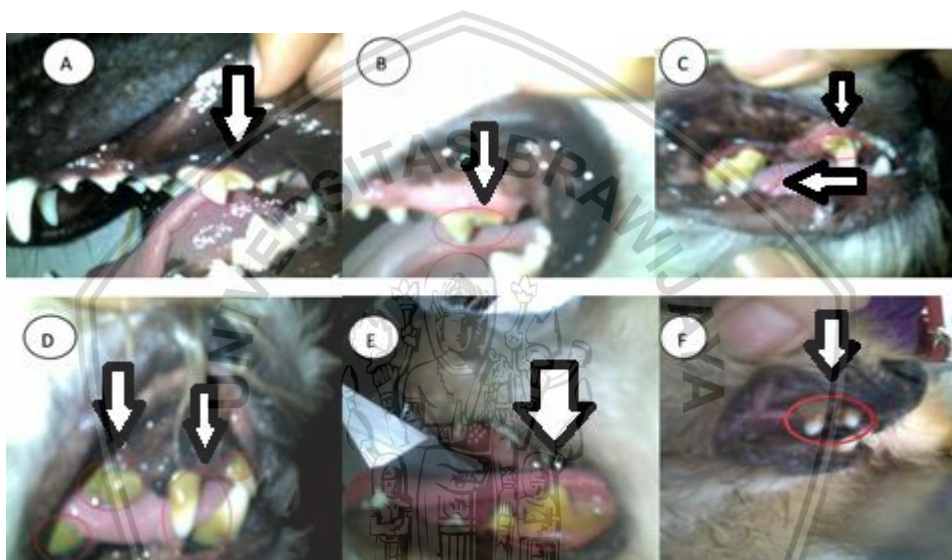
2.1.2 Patologi Anatomi

Pada masalah gigi, hal pertama yang harus diketahui adalah berapa jumlah gigi dan bagaimana gigi tersebut tumbuh. Umumnya, anatomi gigi anjing sama seperti manusia memiliki empat jenis gigi, yaitu gigi incisivus, caninus, premolar, dan molar dengan struktur lapisan seperti pada Gambar 2.1. yang berbeda adalah jumlah dan fungsinya. Secara permanen gigi anjing berjumlah 42 gigi (12 gigi incisivus, 4 gigi caninus, 16 gigi premolar, dan 10 gigi molar). Terlepas dari jumlah akar, fungsi, ukuran, dan bentuk, gigi anjing sama pada semua jenis (Pieri *et al.*, 2012). Gigi yang berada di cavum oral rentan terhadap bakteri, virus, dan jamur yang dapat menyebabkan penyakit periodontal (Hale, 2004).



Gambar 2.1 Struktur gigi anjing (Pieri *et al.*, 2012).

Permasalahan gigi pada anjing yang sering ditemukan adalah karies gigi. Karies gigi berwarna kuning, coklat, dan hitam dilihat dari tingkat keparahannya, seperti pada Gambar 2.2. Karies gigi memiliki permukaan yang kasar sehingga meningkatkan keterikatan bakteri dan plak yang lebih lanjut menyebabkan iritasi gingiva. Noda pada gigi memacu perubahan warna pada permukaan gigi (Kusumawati dkk., 2014).



Gambar 2.2 Ketebalan dan Warna Karies Gigi Anjing di Denpasar Bali. (A) Anjing Kintamani umur 2 tahun, situs karies gigi pada premolar IV, warna gigi kuning dan tipis. (B) Anjing Tersier umur 4 tahun, situs karies gigi pada premolar IV, molai I dan II, warna gigi kuning dan tipis. (C) Anjing Shitzhu umur 5 tahun, situs karies gigi pada caninus, premolar IV, molar I dan II, warna gigi coklat dan tebal. (D) Anjing Golden Retriever umur 6 tahun, situs karies gigi pada premolar III dan IV, molar I dan II, warna gigi coklat dan tebal. (E) Anjing Shitzhu umur 7 tahun, situs karies gigi pada caninus, premolar IV, molar I dan II, warna coklat dan tebal. (F) Anjing Pecking umur 8 tahun, situs karies gigi pada caninus, premolar IV, warna gigi coklat dan tebal (Kusumawati dkk., 2014).

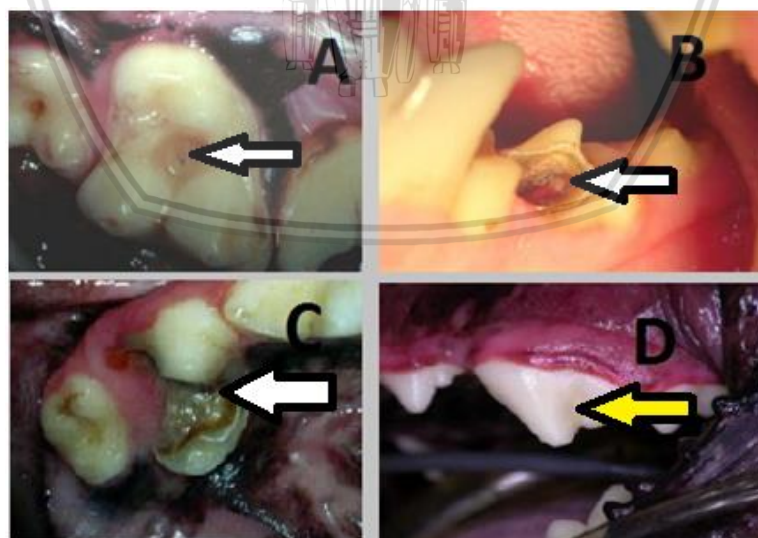
Dari Gambar 2.2 di atas, menunjukkan anjing mulai memiliki karies gigi tebal pada umur tiga tahun, sedangkan pada umur 2 tahun memiliki ketebalan yang tipis. Karies gigi yang tebal rata-rata terjadi pada umur 3-10 tahun, dan di atas umur 5 tahun memiliki ketebalan karies gigi yang tebal. Hal ini dapat dipengaruhi oleh jenis pakan yang diberikan. Bila anjing terus-menerus diberikan

jenis pakan basah dapat memicu terbentuknya plak dan karies gigi karena memiliki konsistensi lembek sehingga sisa-sisa pakan basah akan melekat pada gigi (Kusumawati dkk., 2014).

2.1.3 Diagnosa

Dalam melakukan diagnosa karies gigi pada anjing, sebelumnya harus memperhatikan 5 tahap skoring perubahan patologi, seperti pada Gambar 2.3. yang dijelaskan sebagai berikut:

- Tahap 1: Kerusakan gigi hanya pada enamel.
- Tahap 2: Kerusakan gigi meluas ke dentin, tetapi tidak mencapai ruang pulpa.
- Tahap 3: Kerusakan gigi meluas sampai ke ruang pulpa.
- Tahap 4: Kerusakan struktur gigi yang signifikan dari mahkota gigi.
- Tahap 5: Mayoritas mahkota gigi hilang, terlihat lubang besar, dan yang tersisa adalah akar.



Gambar 2.3 Skoring karies gigi pada anjing. (A) Masuk dalam tahap I, titik hitam pada bagian oklusi gigi molar I merupakan lesi karies pada enamel yang masih bisa dipulihkan. (B) Tahap 3, daerah merah muda merupakan kerusakan gigi sampai pada ruang pulpa. (C) Kerusakan gigi yang sangat parah masuk dalam tahap 5, perlu dilakukan ekstraksi gigi. (D) Gigi yang mengalami restorasi komposit atau perbaikan (Hale, 2004).

Saat diperiksa ke dokter hewan, gigi anjing akan dilihat perubahan pada enamel yang mengalami hipokalsifikasi yang bisa meluas ke dentin, serta diuji stabilitas dentin. Dentin dengan suara keras menandakan gigi dalam keadaan baik atau karies gigi baru pada tahap 1, sedangkan bila dentin lembut maka karies gigi semakin parah. Jika lapisan dentin sudah terkena dan kurang stabilitas, maka perlu dieksplor kerusakan gigi secara menyeluruh. Diagnosa banding berupa fraktur mahkota, keausan, erosi dentin, pewarnaan ekstrinsik. Bila kondisi berkembang menjadi karies dan sudah merambat pada bagian bawah gusi ke dalam akar gigi, maka solusi yang ditawarkan adalah melakukan ekstraksi gigi (Hamilton *et al.*, 2014).

2.1.4 Pencegahan

Kesehatan gigi anjing perlu diperhatikan oleh pemiliknya, dengan rutin menjaga kebersihan mulut, meliputi menyikat gigi (Gambar 2.4) dan membuatkan mainan untuk gigi agar sering mengunyah dan menguatkan. Pasta gigi yang digunakan mengandung fluoride agar enamel gigi lebih resisten terhadap perubahan pH mulut yang menyebabkan karies. Kemudian untuk pakan dilakukan diet proporsional seimbang karbohidrat, dan menjaga keseimbangan pH dalam mulut. Lalu periksakan secara rutin ke dokter hewan untuk memantau ada atau tidaknya lesi baru tiap 6 bulan atau 1 tahun sekali (Hamilton *et al.*, 2014).



Gambar 2.4 Menyikat gigi anjing yang dilakukan oleh pemiliknya (Pieri *et al.*, 2012).

2.1.5. Pengobatan

Beberapa tahapan untuk pengobatan karies gigi, antara lain:

- a. Tahap 1 dan 2: Menghapus karies pada lapisan enamel dan dentin yang tidak mendukung (*scalling*), kemudian memulihkan mahkota gigi dengan amalgam (obat tradisional), terikat dengan restorasi komposit atau bisa dengan menyisipkan pergantian (*Replacement*).
- b. Tahap 3: Melakukan perawatan restoratif terlebih dahulu sebelum mengobati pulpa dan akar.
- c. Tahap 4 dan 5: Ekstraksi gigi menjadi satu-satunya pilihan pengobatan. Dalam lubang di atas permukaan gigi molar rahang atas (*maxilla*) diisi dengan pit dan fissure sealant (Gambar 2.5) untuk mencegah perkembangan karies.



Gambar 2.5 Proses pemasangan pit dan fissure sealant (Hamilton *et al.*, 2014).

Penanganan kondisi karies gigi dalam tahap awal dilakukan dengan memberikan fluoride. Sedangkan bila sudah berkembang pada akar, maka biasanya dilakukan pemeriksaan kondisi gigi secara menyeluruh untuk memutuskan apakah perlu dilakukan restorasi (penambalan) pada daerah gusi. Restorasi dimungkinkan, tetapi ekstraksi biasanya akan menjadi pilihan utama

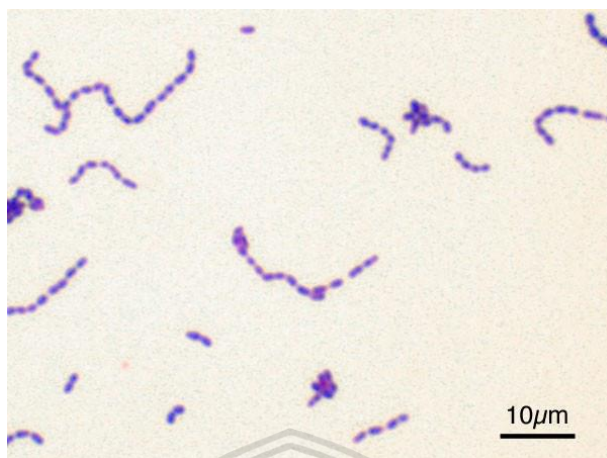
untuk pasien dengan karies gigi yang sudah parah sampai akar. Dalam dunia kedokteran hewan, untuk melakukan restorasi atau ekstraksi, hewan terlebih dahulu di anastesi umum tidak seperti manusia. Pasien dengan resiko tinggi karies gigi perlu diaplikasikan pit dan fissura sealant untuk mencegah karies gigi terjadi lagi (Hamilton *et al.*, 2014).

2.2 *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans merupakan bakteri yang paling penting dalam proses terjadinya karies gigi. Bakteri ini termasuk dalam kelompok *Streptococcus viridians* yang merupakan anggota flora normal rongga mulut baik pada manusia maupun hewan coba yang memiliki sifat α -hemolitik dan komensal oportunistik. (Nomura *et al.*, 2006). Bakteri ini pertama kali diisolasi dari plak gigi oleh Clark pada tahun 1924 yang memiliki kecenderungan berbentuk kokus dengan formasi rantai panjang apabila ditanam pada medium yang diperkaya seperti pada BHI (*Brain Heart Infusion*), dan bila ditanam pada media agar akan memperlihatkan rantai pendek dengan bentuk sel yang tidak beraturan (Grönroos *et al.*, 1998).

2.2.1 Morfologi dan Klasifikasi

Streptococcus mutans merupakan bakteri gram positif (+), bersifat *non motil* (tidak bergerak), bakteri anaerob fakultatif, dan berdiameter 1-2 μm . Memiliki bentuk bulat atau bulat telur, tersusun seperti rantai dan tidak membentuk spora seperti ditunjukkan pada Gambar 2.6. Bakteri ini tumbuh secara optimal pada suhu sekitar 18°C-40°C (Maksum, 2009).



Gambar 2.6 Morfologi *Streptococcus mutans* (Maksum, 2009).

Klasifikasi *Streptococcus mutans* menurut Holt *et al.* (1998) adalah:

Kingdom	: Monera
Divisio	: Firmicutes
Class	: Bacili
Order	: Lactobacilalles
Family	: Streptococcaceae
Genus	: Streptococcus
Species	: <i>Streptococcus mutans</i>

Streptococcus mutans bersifat asidogenik, yaitu menghasilkan asam asidurik yang mampu tinggal pada lingkungan asam, dan menghasilkan suatu polisakarida yang lengket disebut dengan dextran. Oleh karena kemampuannya ini, maka bakteri ini dapat menyebabkan lengket dan mendukung bakteri lain menuju ke email gigi dan melarutkannya (Jawetz *et al.*, 2004).

2.2.2 Faktor Virulensi

Sifat virulensi melibatkan derajat patogenitas berupa kemampuan mikroorganisme menimbulkan kerusakan pada hospes. Virulensi terdiri atas sifat

bakteri dalam berinteraksi dengan hospes, faktor lain yang meningkatkan masuknya bakteri, kolonisasi dan pertumbuhan patogen pada hospes, serta kemampuan dalam melawan pertahanan dari hospes untuk memperoleh nutrisi (Octiara dan Budiardjo, 2008).

Faktor-faktor virulensi *Streptococcus mutans* menurut Octiara dan Budiardjo (2008) meliputi, kemampuan untuk memproduksi adhesin, enzim glukosiltransferase dan glucan-binding protein seperti yang dijelaskan berikut ini:

a. Adesin

Adesin memiliki banyak fungsi di antaranya yaitu menginisiasi perlekatan *Streptococcus mutans* pada partikel di permukaan gigi melalui sel reseptor saliva dan berperan dalam koagregasi dengan bakteri lain.

b. Enzim Glukosiltransferase(GTFs)

Fungsi GTFs pada *Streptococcus mutans* yaitu mensintesa sukrosa menjadi adhesive glukon. Glukon ini merupakan perantara kuat melekatnya sel bakteri ke permukaan gigi dan juga perlekatan antara bakteri sendiri. Adanya glukon juga dapat memodulasi permeabilitas plak dengan meningkatkan jumlah produk asam pada permukaan gigi serta bertindak sebagai sumber energi bagi bakteri.

c. Glucan-Binding Protein (GBP)

Streptococcus mutans berinteraksi dengan glukon melalui Glucan-Binding Protein (Gbps). *Streptococcus mutans* memproduksi beberapa Glucan-Binding Protein (Gbps) yaitu GbpA, GbpB, GbpC, dan GbpD. Gbps bertindak sebagai mediator pengikat sintesa glukon yang berasal dari sukrosa

yang dihasilkan oleh enzim GTFs. Peran Gbps dalam virulensi *Streptococcus mutans* diimplikasikan dalam bentuk kohesi pembentukan plak, dan atau perlekatan sel serta akumulasi *Streptococcus mutans* dalam plak.

Berbagai faktor virulensi *Streptococcus mutans* memainkan peran penting dalam pembentukan karies. Bagaimanapun, faktor virulensi yang paling penting adalah sifat asidofilik *Streptococcus mutans* (Nishimura *et al.*, 2012).

2.2.3 Hubungan dengan Karies Gigi

Streptococcus mutans memiliki sifat-sifat yang membedakannya dengan bakteri lainnya di dalam rongga mulut. Sehingga bakteri ini berperan paling dominan pada proses karies gigi, dan disebut sebagai bakteri spesifik. Sifat-sifat tersebut antara lain:

- a. Kemampuannya dalam membentuk asam, pada tingkatan pH tertentu, bakteri-bakteri lainnya akan berhenti membentuk asam. Ini tidak terjadi pada *Streptococcus mutans*, sehingga bakteri ini bersifat sangat tahan asam.
- b. Kemampuan untuk membuat bahan cadangan makanan intraseluler yang serupa dengan glikogen. Sintesa dari polisakarida intraseluler ini terjadi bila ada gula dalam jumlah yang berlebihan. Apabila persediaan gula yang eksogen sudah habis terpakai, maka bakteri *Streptococcus mutans* akan memecah kembali polisakarida intraseluler yang sudah disimpannya.
- c. Kemampuan *Streptococcus mutans* untuk membuat polisakarida ekstraseluler dengan konsistensi seperti perekat. Sehingga bakteri ini dapat melekat dan bertahan meskipun ada daya pembersih dari lidah dan saliva, serta mendorong terbentuknya plak dan kerusakan gigi (Nasution, 2006).

Berdasarkan penelitian Konig and Hoogendorn (1982), terhadap semua jenis bakteri yang ada pada plak, menunjukkan bahwa hanya *Streptococcus mutans* saja yang mempunyai korelasi positif dengan adanya karies di permukaan gigi. Hal ini berdasarkan atas fakta bahwa *Streptococcus mutans* stabil dalam jumlah besar, sangat diasosiasikan dengan pengembangan lesi karies pada email. Perbandingan dengan jenis bakteri oral lain yang diduga memiliki peran besar pada proses karies gigi, yaitu *Lactobacillus asidofilus* yang menunjukkan bahwa *Lactobacillus* terkadang tidak ditemukan pada plak di atas email yang sehat, sedang pada plak kariogenik jumlah *Streptococcus mutans* adalah seribu kali lebih banyak daripada jumlah *Lactobacillus*. Disamping itu, *Streptococcus mutans* memenuhi postulat Koch sebagai penyebab karies karena:

- a. *Streptococcus mutans* ditemukan dalam plak gigi karies dan biasanya tidak dapat diisolasi dari yang bebas karies.
- b. Organisme ini dapat tumbuh dalam kultur murni.
- c. Infeksi pada tikus bebas kuman atau hamster normal *Streptococcus mutans* berupa karies.
- d. Organisme karies tersebut dapat ditemukan kembali dari lesi karies dan tumbuh dalam kultur normal.
- e. Antibodi terhadap organisme ini meningkat pada penderita dengan karies (Nasution, 2006).

Koloni *Streptococcus mutans* yang dilapisi glukon dapat menurunkan sifat saliva sebagai pelindung dan antibakteri pada plak gigi. Secara fisik plak dapat menghambat difusi asam ke dalam saliva, akibatnya terjadi lokalisasi

produk asam dengan konsentrasi yang tinggi pada permukaan email. Asam ini akan melepaskan ion hydrogen yang akan bereaksi dengan Kristal apatit, sehingga Kristal apatit menjadi tidak stabil. Selain itu akan terbentuk air dan fosfat yang larut, yang akhirnya akan menghancurkan membrane email. Dengan hancurnya membrane email, asam yang terbentuk akan berpenetrasi lebih jauh dan akan melarutkan Kristal apatit pada lapisan yang lebih dalam dan mengakibatkan dekalsifikasi dentin. Dekalsifikasi dentin akan menimbulkan karies gigi berupa lubang yang menjadi tempat tersangkutnya sisa-sisa makanan. Bila hal ini dibiarkan terus-menerus terulang, maka akan terjadi efek saling menguatkan (Nasution, 2006).

2.3 Kefir Susu Kuda Sumbawa

2.3.1 Susu Kuda Sumbawa

Susu adalah salah satu diantara hasil produksi peternakan yang penting dan mempunyai nilai gizi yang tinggi (Yuniati dan Sahara, 2012). Biasanya susu yang dikonsumsi atau produk susu yang dipasarkan berasal dari susu sapi, karena memang produksinya lebih besar dibanding ternak lain seperti kambing dan kuda. Susu kuda sebenarnya mengandung nilai gizi mendekati ASI (air susu ibu), tetapi pada umumnya masyarakat di Indonesia belum mengetahuinya. Susu kuda dipercaya memiliki banyak manfaat, dianggap sebagai agen kuratif terhadap penyakit metabolik dan alergi. Kelebihan susu kuda dibanding susu sapi adalah lebih mudah dicerna, karena kandungan protein kaseinnya lebih rendah yakni sebesar 50% dibandingkan protein kasein susu sapi sebesar 80%. Protein kasein

yang rendah ini membentuk gumpalan yang lunak di saluran pencernaan. Susu kuda jarang menimbulkan alergi, dan akhir-akhir ini banyak digunakan sebagai pengobatan alternatif yang tersedia di toko-toko makanan kesehatan (Nurliyani, dkk. 2005). Susu kuda dapat digunakan sebagai penunjang kekebalan tubuh karena adanya kandungan vitamin, salah satunya vitamin C sebesar 8,65 mg/ 100 ml yang lebih tinggi apabila dibandingkan dengan susu sapi dengan kandungan vitamin C sebesar 2 mg/ 100 ml, serta mineral dan kandungan bioaktif susu yaitu immunoglobulin dan galactoferin (Yuniati dan Sahara, 2012).

Susu kuda mengalami fermentasi alamiah (*auto fermentasi*) yang memberikan dampak menyehatkan sama seperti yogurt, ataupun susu sapi terfermentasi. Kandungan laktosa paling tinggi adalah 6,2 gr/ 100 gr susu kuda, sedangkan susu sapi hanya mencapai kadar 4,7 gr/ 100 gr susu. Kandungan laktosa yang tinggi menyebabkan susu kuda Sumbawa terfermentasi memiliki pH yang sangat rendah yaitu berkisar antara 3-4 yang diakibatkan oleh fermentasi BAL dan khamir (yeast) pada suhu tropis Indonesia. Selain itu kandungan protein susu kuda paling rendah (1,9 gr/100 gr), dimana susu sapi mengandung 3,9 gr/200gr (Sujaya dkk., 2008).

Bioaktif protein susu kuda mengandung zat bioaktif dengan berat molekul yang rendah yaitu antara 14.400 kD (Lisosim) dan 21.000 kD (Inhibitor tripsin). Lisozim memiliki aktifitas anti mikroba. Enzim ini berfungsi dalam kaitannya dengan galaktoferin dan immunoglobulin A (Ig A). Kemampuan lisozim dalam membatasi migrasi neutrofil ke jaringan yang rusak memberikan kemungkinan untuk menggunakan lisosim sebagai agen *anti inflamatori* (anti

radang). Keunggulan lain dari susu kuda adalah terdapat aktivitas anti mikroba yang sangat kuat, hal tersebut tidak ditemukan pada susu sapi (Nurliyani, 2003).

Susu kuda Sumbawa yang dikenal luas di masyarakat sebagai susu kuda liar merupakan susu hasil perahan kuda yang dilepas di padang rumput di beberapa tempat, seperti di Kabupaten Bima, Dompu dan Sumbawa Provinsi Nusa Tenggara Barat. Sejak tahun 1980, susu kuda Sumbawa banyak diklaim dapat memberikan dampak menguntungkan terhadap kesehatan seperti membantu proses penyembuhan berbagai penyakit infeksi seperti bronchitis, paru-paru basah, tifus, menurunkan kolesterol, dan diabetes melitus (Sujaya dkk., 2012). Menurut Hermawati dkk. (2004), bahwa susu kuda Sumbawa mempunyai aktivitas antimikroba yang kuat, yang tidak dapat ditemukan pada susu kuda bukan Sumbawa dan susu sapi yang diuraikan seperti pada Tabel 2.1. Selain itu, susu kuda Sumbawa mempunyai aktivitas antimikroba dengan spectrum luas termasuk terhadap 9 jenis bakteri (*Shigella boydii*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholera*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Mikrococcus luteus*), baik gram positif maupun gram negatif, berspora maupun non spora yang dilihat pada Tabel 2.2. Selain itu, menurut Widiada dkk. (2006) yang telah melakukan eskplorasi bakteri asam laktat yang terlibat dalam proses fermentasi susu kuda Sumbawa selama penyimpanan pada suhu ruang, spesies bakteri asam laktat yang dapat tumbuh yaitu *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus salivarius* dan *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*.

Tabel 2.1 Aktivitas Antimikroba Susu Kuda Sumbawa, Susu Kuda Bukan Sumbawa dan Susu Sapi

No.	Asal Sampel	Jumlah sampel	Rata-rata Aktivitas Antimikroba	
			Diameter (mm)	Luas (mm)
I	KUDA SUMBAWA			
1	Peternak			
	a. Ds. Palma Donga, Bima	20	20,33	324,7
	b. Ds. Mpili, Donga, Bima	15	18,28	262,6
	c. Ds. Taloko, Sanggau, Bima	10	34,44	931,9
	d. Ds. Tolonggaru, Madapanga, Bima	10	23,29	426,2
	e. Ds. Penyaring, Mojo Ilir, Sumbawa	25	17,68	245,6
	f. Ds. Omohilir, Sumbawa	15	15,18	181,1
2.	Pedagang			
	a. Jabotabek	10	20,59	333,1
3.	Pengumpul			
	a. Bima	10	34,63	942,3
II	KUDA BUKAN SUMBAWA			
1	Kuda Beban			
	a. Bogor	5	0	0,0
	b. Lembang	5	0	0,0
	c. Salatiga	10	0	0,0
2.	Kuda Pacu *)			
	a. Pamulang	2	12,4	120,8
III	SAPI PERAH (FH)			
	a. Depok	15	0	0,0
IV	ANTIBIOTIKA KONTROL	4 Jenis	20,33	324,7

Keterangan: Aktivitas antimikroba menggunakan bakteri uji *Mikrococcus luteus* ATCC 9341. *) Persilangan antara Kuda Betina Sumba dan Kuda Jantan *Thoroughberd* (Sumber: Hermawati dkk., 2004).

Tabel 2.2 Uji Sensitivitas Antimikroba Terhadap Berbagai Bakteri Patogen dan Perusak Pangan

No.	Jenis Bakteri	Gram	Sifat Bakteri	Asal susu	
				Kuda Sumbawa	Bukan Kuda Sumbawa
				Luas (mm ²)	Luas (mm ²)
1.	<i>Shigella boydii</i>	-	Patogen	115,4	0,0
2.	<i>Salmonella typhimurium</i>	-	Patogen	193,2	0,0
3.	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	Patogen	210,0	0,0
4.	<i>Vibrio cholera</i>	-	Patogen	462,1	85,8*
5.	<i>Bacillus cereus</i>	-	Patogen dan Perusak Pangan	351,8	0,0
6.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Patogen dan Perusak Pangan	198,4	0,0
7.	<i>E. coli</i>	-	Patogen dan Perusak Pangan	287,5	0,0
8.	<i>Bacillus subtilis</i>	-	Perusak Pangan	322,5	107,74*
9.	<i>Mikrococcus luteus</i>	-	Perusak Pangan	387,9	0,0

(Sumber: Hermawati dkk., 2004)

2.3.2 Kefir

Susu fermentasi yang sering kita jumpai di lingkungan masyarakat adalah yoghurt dan kefir. Kedua jenis susu fermentasi ini memiliki karakteristik yang berbeda, proses pembuatan dan starter yang digunakan pun berbeda. Pembuatan yoghurt dilakukan melewati proses pemanasan pada suhu 82-85°C selama 30 menit dan ditambahkan starter *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus bulgaricus*. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Nurliyani dkk., (2014)

dengan proses pembuatan kefir di atas menunjukkan bahwa yoghurt yang dibuat dari susu kuda mempunyai kandungan laktosa yang relative masih tinggi, asam laktat yang rendah, dan pH berkisar antara 4,7 – 5. Penurunan kadar laktosa yang relatif kecil pada yoghurt susu kuda disebabkan starter yoghurt yang ditumbuhkan pada susu kuda kurang optimum pertumbuhannya untuk memetabolisme laktosa menjadi asam laktat, karena di dalam susu kuda mengandung lisozim yang tinggi dibanding susu dari hewan ternak yang lain (sapi, domba dan kambing). Disamping itu laktoferin susu kuda juga lebih tinggi yang berperan sebagai antimikroba dan antiviral. Penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa suhu optimum untuk pemanasan susu kuda adalah 60°C, dan apabila dipanaskan dengan di atas suhu tersebut akan menyebabkan dinding bakteri non-pathogen yang terkandung dalam susu kuda mengalami kerusakan.

Kefir adalah produk susu yang difermentasikan dengan menggunakan bakteri asam laktat seperti *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bersama ragi dan menghasilkan asam dan alkohol. Pada tahap akhir proses dilakukan pematangan dalam kemasan tertutup agar terbentuk karbonat. Bakteri yang dominan pada kefir adalah dari golongan *Lactobacillus* (Surono, 2004). Kefir melalui proses fermentasi susu menggunakan starter berupa butir atau biji kefir (*kefir grain/kefir granule*), yaitu butiran-butiran putih atau krem dari kumpulan bakteri asam laktat, salah satunya *Lactobacilli* dan beberapa jenis ragi/khamir nonpatogen. Kefir dinyatakan sebagai probiotik alami dan bakteri di dalam kefir grain yang teridentifikasi berupa: *Lactobacillus lactis* subsp. *Lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. casei* subsp.

Pseudoplantarum, dan *L. brevis*, sedangkan ragi yang teridentifikasi yaitu *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida inconspicua* dan *Candida maris* (Nurliyani dkk., 2014). Bakteri berperan menghasilkan asam laktat yang dapat menghambat bakteri *pathogen* dan komponen *flavor*, sedangkan ragi menghasilkan gas asam arang atau karbon dioksida (CO₂), diasetil, asetaldehida dan hydrogen peroksida, sedikit alkohol serta bakteriosin sebagai suatu senyawa protein yang menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri sejenis (Surono, 2004).

Kandungan zat gizi kefir hampir sama dengan susu yang digunakan sebagai bahan kefir namun memiliki berbagai kelebihan bila dibandingkan dengan susu segar. Kelebihan tersebut yaitu adanya 1) asam yang terbentuk dapat memperpanjang masa simpan, mencegah pertumbuhan mikroorganisme pembusuk sehingga mencegah pertumbuhan mikroorganisme patogen dan meningkatkan ketersediaan vitamineral (B2, B12, asam folat, fosfor dan kalsium) yang baik untuk tubuh; 3) mengandung mineral dan asam amino esensial (tryptopan) yang berfungsi sebagai unsur pembangun, pemelihara, dan memperbaiki sel yang rusak, 4) fosfor dari kefir membantu karbohidrat, lemak dan protein dalam pembentukan sel serta untuk menghasilkan tenaga; 5) mengandung kalsium (Ca) dan magnesium (Mg) serta Chromium (Cr) sebagai unsur mineral mikro esensial (Surono, 2004).

Kefir susu kuda Sumbawa merupakan salah satu minuman probiotik yang banyak manfaatnya bagi tubuh. Probiotik juga bertindak sebagai imunostimulator. Pemberian probiotik juga dapat mengurangi pemberian antibiotik. Konsumsi

probiotik yang mengandung bakteri asam laktat terbukti mencegah terjadinya kanker pada hewan percobaan (Kusumawati dkk., 2008). Probiotik menghambat bakteri patogen secara spesifik dengan cara: menghambat adesi, kolonisasi dan formasi biofilm, serta menghambat pertumbuhan bakteri patogen dari berbagai substansi. Strategi pengobatan agen probiotik juga mempunyai efek pada respon imun host, yaitu: (a) Menghambat kolonisasi dan reduksi asosiasi molekul, (b) Induksi ekspresi dari sitoprotektif protein pada permukaan sel host, (c) Induksi jalur modulator proinflamasi dari bakteri pathogen, (d) Mencegah induksi sitokin apoptosis, dan (e) Menstimulasi respon sistem imun host (Gupta dan Gupta, 2010).

Mekanisme kerja mikroba probiotik dapat menghasilkan bahan antimikroba (bakteriosin) yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba lain yang tidak menguntungkan. Selain itu pemberian probiotik juga dapat meningkatkan fagositosis makrofag. Makrofag sangat berperan dalam sistem imun, terutama pada reaksi-reaksi inflamasi dan infeksi. Peranan tersebut ditunjang oleh kemampuan makrofag mempresentasikan antigen, fagositosis bakteri-bakteri patogen, melepaskan enzim-enzim proteolitik, radikal-radikal oksigen, dan sekresi sitokin (Winarsih dkk., 2007).

Berdasarkan rincian penjelasan di atas tentang manfaat susu kuda Sumbawa dan kefir bagi kesehatan, diharapkan dengan pembuatan kefir susu kuda dapat menjadi antimikroba dengan spektrum yang luas sekaligus sebagai immunostimulator.

2.4 Respon Imun Oral (Sitokin)

Pada reaksi imunologik atau reaksi inflamasi banyak substansi berupa hormon dan faktor pertumbuhan yang dilepaskan oleh limfosit T dan B maupun oleh sel-sel lain, yang berfungsi sebagai sinyal interselular yang mengatur aktivitas sel yang terlibat dalam respon imun dan respon inflamasi lokal maupun sistemik terhadap rangsangan dari luar. Sekresi substansi itu dibatasi sesuai kebutuhan (*self-limiting*), substansi-substansi tersebut secara umum dikenal dengan nama sitokin (*cytokine*). Sitokin adalah polipeptida yang diproduksi sebagai respons terhadap mikroba dan antigen lain yang memperantarai dan mengatur reaksi imunologik dan reaksi inflamasi (Kresno, 2013).

Sitokin berperan dalam imunitas spesifik, dan mengawali, mempengaruhi serta meningkatkan respon imun nonspesifik. Pada imunitas nonspesifik, sitokin diproduksi makrofag dan sel NK yang berperan pada inflamasi dini, merangsang proliferasi, diferensiasi dan aktivasi sel efektor khusus seperti makrofag. Pada imunitas spesifik sitokin yang diproduksi sel T mengaktifkan sel-sel imun spesifik (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010). Efek biologis sitokin timbul setelah diikat oleh reseptor spesifiknya yang diekspresikan pada membran sel organ sasaran. Pada saat fagositosis, bakteri dikenali dan diikat dengan reseptor sel fagosit, kemudian ditelan. Pada saat bersamaan, reseptor mengirimkan sinyal untuk mengaktifkan enzim-enzim yang terdapat di fagolisosom yang berperan untuk membunuh bakteri tersebut. Sitokin disintesis oleh sebagian besar sel hospes dalam menanggapi bakteri dan produknya. Bakteri endotoksin eksopolisakarida mampu merangsang leukosit polymorphnuclear untuk melepaskan sitokin

inflamasi dan juga inhibitor mereka. Berbagai kelompok sitokin salah satunya adalah IL (*interleukin*) dan TNF (*Tumor Necrosis Factor*). Adapun berdasarkan sifatnya, sitokin pro-inflamasi (TNF- α) muncul ketika terjadi peradangan, sedangkan ekspresi gen ditekan oleh sitokin anti-inflamasi (IL-10) (Handajani, 2006).

2.4.1 *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF- α)

TNF merupakan mediator utama pada respon inflamasi akut terhadap bakteri gram negatif, dan berperan dalam respon imun bawaan terhadap berbagai mikroorganisme penyebab infeksi yang lain, serta bertanggung jawab atas banyak komplikasi sistemik yang disebabkan infeksi berat. Ada dua bentuk TNF, yaitu TNF- α dan TNF- β . TNF- α diproduksi oleh berbagai jenis sel termasuk makrofag, sel T, B, NK, astrosit dan Kupfer. Pembentukan terjadi sebagai respon terhadap rangsangan bakteri, virus dan sitokin (GM-CSF, IL-1, IL-2, IFN- γ), serta kompleks imun (Kresno, 2013). Pada kadar rendah, TNF bekerja terhadap leukosit dan endotel, menginduksi inflamasi akut. Pada kadar sedang, TNF berperan dalam inflamasi sistemik. Pada kadar tinggi, TNF menimbulkan kelainan patologik syok septik (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).

2.4.2 Interleukin 10

IL-10 merupakan inhibitor makrofag dan sel dendritik yang berperan dalam mengontrol reaksi imun nonspesifik dan imun selular. IL-10 diproduksi terutama oleh makrofag yang diaktifkan. Hal tersebut merupakan contoh dari regulator *feedback* negatif (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010). Dua fungsi utama IL-10 adalah menghambat produksi beberapa jenis sitokin, seperti TNF, IL-

1, chemokine, dan IL-12, serta menghambat fungsi makrofag dan sel dendritik dalam membantu aktivasi sel T, sehingga bersifat immunosupresi. Hambatan fungsi makrofag terjadi karena IL-10 menekan ekspresi molekul MHC kelas II pada makrofag, dan mengurangi ekspresi ko-stimulator. Dampak akhir dari aktivitas IL-10 adalah hambatan reaksi inflamasi nonspesifik maupun spesifik yang diperantarai sel T, karena itu IL-10 juga disebut *cytokine synthesis inhibitory factor* dan sitokin anti-inflamasi (Kresno, 2013).

2.4.3 Immunostimulator

Pada keadaan normal, paparan mikroorganisme patogen terhadap tubuh seperti *S. mutans* dapat dilawan oleh sistem pertahanan tubuh (sistem imun). Hal ini berhubungan dengan peran yang ditunjukkan oleh fungsi dan jumlah sel imun. Namun, pada saat fungsi dan jumlah sel imun kurang memadai, paparan mikroorganisme patogen dapat menimbulkan berbagai penyakit terutama terkait dengan penyakit infeksi seperti karies gigi. Oleh karena itu, upaya dalam mempertahankan sistem imun tetap maksimal menjadi sangat penting sehingga mampu menghadapi serangan zat asing seperti mikroorganisme patogen. Salah satunya adalah dengan pemberian imunomodulator, terutama zat yang meningkatkan sistem imun atau immunostimulator (Tjay dkk., 2007). Imunomodulator adalah obat yang dapat mengembalikan dan memperbaiki sistem imun yang fungsinya terganggu atau untuk menekan yang fungsinya berlebihan, sedangkan immunostimulator adalah senyawa yang dapat meningkatkan respon imun. Immunostimulator dapat mereaktivasi sistem imun dengan berbagai cara

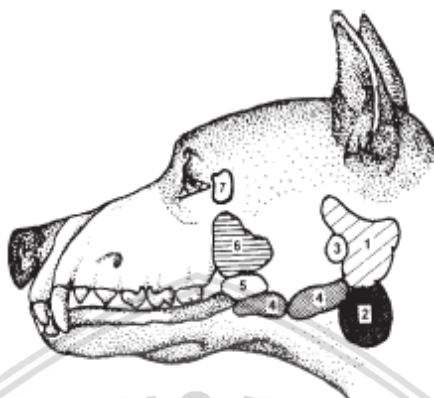
seperti meningkatkan jumlah dan aktivasi sel T, *NK-cells* dan makrofag serta melepaskan interferon dan interleukin (Handayani, 2010).

2.5 Glandula Saliva

Saliva (air liur) adalah gabungan dari berbagai macam cairan dan komponen yang diekskresikan ke dalam rongga mulut. memiliki peranan penting dalam homeostasis antara lain mempengaruhi higiene mulut dan memulai pencernaan karbohidrat. Peran lainnya adalah sebagai antibakteri karena mengandung lizozim, IgA, peroxidase, dan sebagai pembasah mukosa mulut, bufer, dan mengandung enzim-enzim pencernaan seperti amilase dan lipase. Pada tubuh, saliva diproduksi oleh glandula (kelenjar) saliva. Sebagian besar hewan memiliki kelenjar saliva

Kelenjar saliva adalah suatu kelenjar eksokrin yang berperan penting dalam mempertahankan kesehatan jaringan mulut. Kelenjar saliva merupakan organ yang terbentuk dari sel-sel khusus yang mensekresi saliva ke dalam rongga mulut yang bermanfaat untuk membantu pencernaan, mencegah mukosa dari kekeringan, memberikan perlindungan pada gigi terhadap karies serta mempertahankan hemeostasis (Tamin dan Yassi, 2010). Kelenjar saliva dibagi menjadi 2 kelompok, yakni mayor dan minor. Kelenjar saliva mayor dan minor menghasilkan saliva yang berbeda-beda menurut rangsangan yang diterimanya. Rangsangan ini dapat berupa rangsangan mekanis (mastikasi), kimiawi (manis, asam, asin, dan pahit), neural, psikis (emosi dan stres), dan rangsangan sakit

(Capaccio *et al.*, 2002). Adapun anatomi kelenjar saliva yang berkaitan dengan fisiologi saliva seperti pada Gambar 2.7.



Gambar 2.7 Anatomi kelenjar ludah pada Anjing. (1) kelenjar parotis, (2) kelenjar mandibulari, (3) limfonodus parotis, (4) kelenjar sublingualis, (5) kelenjar palatinus, (6) kelenjar zigomatikus, dan (8) kelenjar lakrimalis (Depamede dkk., 2014).

Saliva atau air liur adalah cairan biologis yang kompleks dan unik, disekresikan ke dalam rongga mulut oleh kelenjar-kelenjar ludah seperti pada gambar 2.7. Saliva mempunyai peranan penting dalam melindungi gigi dari karies. Sekresi saliva akan membasahi gigi dan mukosa mulut sehingga gigi dan mukosa tidak menjadi kering. Saliva membersihkan rongga mulut dari debris-debris makanan sehingga bakteri tidak dapat tumbuh dan berkembang biak. Antibodi saliva mampu mengaglutinasi bakteri *Streptococcus mutans* sehingga jumlahnya dalam rongga mulut berkurang dan akhirnya akan mengurangi jumlah karies. Menurunnya pH saliva (asam) dan jumlah saliva yang kurang menunjukkan resiko terjadinya karies yang tinggi (Tamin dan Yassi, 2010).

2.6 Hewan Coba Mencit (*Mus musculus*)

Hewan percobaan adalah setiap hewan yang digunakan pada sebuah penelitian biologis dan biomedis yang dipilih berdasarkan syarat atau standar

dasar yang diperlukan dalam penelitian tersebut. Hewan percobaan yang dipelihara untuk tujuan penelitian, umumnya berada dalam suatu lingkungan yang sempit dan terawasi. Hewan percobaan ditempatkan dalam kandang-kandang yang disusun pada rak-rak didalam suatu ruangan khusus. Kandang harus dirancang untuk dapat memberikan kenyamanan dan kesejahteraan bagi hewan tersebut (Kurnianto dkk., 2001).

Mencit merupakan hewan percobaan yang dapat sering digunakan dalam penelitian *in vivo*. Tetapi karena hewan ini paling kecil di antara berbagai jenis hewan percobaan dan karena amat banyak galurnya, sehingga hewan ini disebut mencit, dapat dilihat pada Gambar 2.8. Mencit liar atau mencit rumah adalah hewan semarga dengan mencit laboratorium. Semua galur mencit laboratorium yang ada pada saat ini merupakan turunan dari mencit liar sesudah melalui peternakan selektif (Akbar, 2010). Adapun taksonomi mencit sebagai berikut:

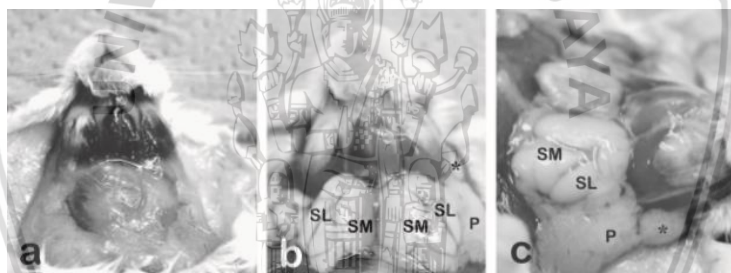
Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae
Genus	: Mus
Spesies	: <i>Mus musculus</i>

Mencit laboratorium mempunyai berat badan yang hampir sama dengan mencit liar, yaitu 18-20 gram pada umur 4 minggu dan 30-40 gram pada umur 6 minggu atau lebih, tetapi setelah ditenakkan secara selektif sejak tahun 1920,

sekarang ada berbagai warna dan timbul banyak galur dengan berat badan berbeda-beda, contohnya mencit galur balb/c betina umur 2 bulan memiliki berat badan 20-30 gram. Mencit laboratorium dapat diletakkan dalam kandang kotak dengan berbagai bahan seperti plastik, alumunium, atau baja tahan karat (Akbar, 2010).



Gambar 2.8 Mencit Strain Balb/c Jantan (Suzuki *et al.*, 1998)

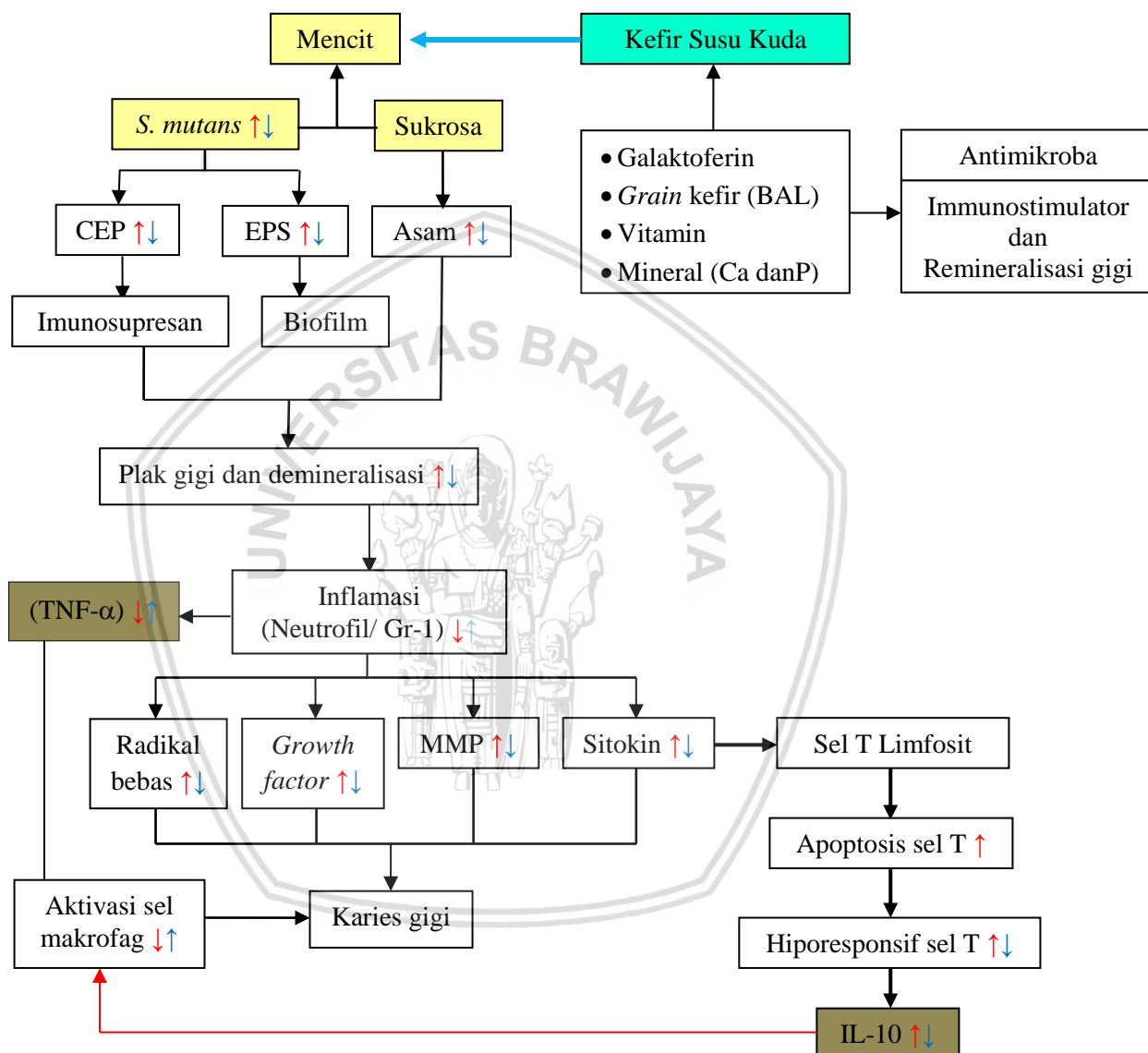


Gambar 2.9 Anatomi makroskopis glandula saliva mencit. (a) Sebelum, (b,c) sesudah di incisi dan dihilangkan jaringan lemak. (P) glandula parotis, (SM) glandula submandibularis, dan (SL) glandula sublingualis (Sumber: Amano *et al.*, 2012)

Mencit merupakan golongan hewan mamalia yang memiliki kemampuan berkembangbiak yang sangat tinggi, mudah dipelihara dan menunjukkan reaksi yang cepat terlihat jika digunakan sebagai objek penelitian. Berdasarkan studi sebelumnya, genetik dapat mempengaruhi tingkat kejadian karies sebesar 40% yang disesuaikan dengan umur dan jenis kelamin (Walter *et al.*, 2003). Menurut Suzuki *et al.* (1998), hasil penelitiannya menunjukkan bahwa mencit strain BALB/c memiliki skor karies tinggi pada penelitian hewan model karies gigi.

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3. Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan gambar:

- Kefir Susu Kuda Variabel bebas
- (TNF-α) ↓↑ Variabel tergantung
- Mencit Variabel kendali
- Pengaruh infeksi *S. mutans*
- Pengaruh pemberian kefir susu kuda

Kefir susu kuda Sumbawa merupakan minuman probiotik yang mengandung *galaktoferin*, vitamin, mineral, dan *gran* kefir (BAL). Galaktoferin merupakan protein pada susu yang bersifat bakteriostatik dan bakteriosidal terhadap mikroorganisme patogen seperti *S. mutans* dengan cara mengikat ion Fe^{3+} yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroorganisme. Sedangkan vitamin dan mineral dapat berfungsi untuk remineralisasi gigi. *Grain* kefir dari bakteri asam laktat seperti *Lactobacillus sp.* merupakan produk probiotik yang memiliki sifat tahan asam dan pH tinggi maupun rendah yang dapat berfungsi sebagai immunostimulator, serta bakteriosin yang berfungsi sebagai antibakteri. Berdasarkan kandungan tersebut, kefir susu kuda Sumbawa dapat menghambat kolonisasi bakteri *S. mutans* dan reduksi asosiasi molekul, induksi jalur stimulasi pro-inflamasi dari bakteri *S. mutans*, mencegah induksi sitokin apoptosis, serta menstimulasi respon sistem imun hospes. Mekanisme kerja dari probiotik terhadap gigi yaitu melindungi lapisan permukaan gigi dan akibatnya bakteri tidak mampu untuk melekat dan berkolonisasi di permukaan gigi. Bakteri asam laktat merupakan substansi yang dapat meningkatkan sel granulosit dan menurunkan produksi sel T Limfosit.

Proses terjadinya karies gigi disebabkan oleh adanya interaksi antara gigi (hospes), mikroorganisme, makanan kariogenik, dan waktu. Makanan kariogenik seperti sukrosa sangat efektif menimbulkan karies karena akan menyebabkan pH saliva turun drastis menjadi 5,5 atau kurang (asam), dan memudahkan terjadinya demineralisasi. *Streptococcus mutans* memproduksi adhesin yang menginisiasi perlekatan bakteri dengan permukaan gigi. Selain itu, *S. mutans* juga

menghasilkan enzim glukosiltransferase (GTFs) yang bersama dengan sukrosa menjadi adhesive glukan. Glukan ini merupakan perantara kuat melekatnya bakteri ke permukaan gigi dan memodulasi permeabilitas plak dengan meningkatkan jumlah produksi asam. *S. mutans* juga menghasilkan EPS (Eksopolisakarida) yang membantu bakteri membentuk biofilm serta CEP (*Crude Extracellular Product*) suatu substansi yang memiliki efek menghambat sistem imun dengan mengaktifkan sel T suppressor. EPS, CEP, dan asam yang meningkat akibat perlekatan *S. mutans* dan sukrosa inilah yang menyebabkan agregasi sel, terbentuk plak, demineralisasi dan kavitas pada permukaan gigi. Hal ini apabila semakin lama dibiarkan akan menyebabkan kerusakan jaringan gigi, dan hydrogen peroksida yang dihasilkan *S. mutans* menyebabkan membran sel neutrofil (Gr-1) dan makrofag mengalami apoptosis. Membran sel neutrofil dan sel makrofag yang mengalami apoptosis akan menyebabkan bakteri berkembang dan menginfeksi lebih banyak sehingga sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α akan menurun produksinya. Pada tahap awal inflamasi, terjadi proses fagositosis yang melibatkan oksigen sehingga terbentuk radikal bebas untuk membunuh mikroorganisme. Selanjutnya terjadi tahap *remodelling* yang dilakukan oleh *Growth Factor* dan MMP. Tetapi apabila infeksi semakin parah, maka kerusakan jaringan semakin tinggi dan akan menginduksi sitokin lanjutan. Sitokin sebagai sel imun lanjutan yang terekspresi dihasilkan oleh berbagai sel, salah satunya sel T Limfosit. Sel T terdiri dari sel T CD4⁺ dan sel T CD8⁺, sel T CD4⁺ sendiri terdiri dari Th1 dan Th2. Sifat imunosupresan dari *S. mutans* menyebabkan apoptosis sel T dan hiporesponsif, sehingga menurunkan produksi sitokin pro-

inflamasi yang dihasilkan oleh sel T CD4⁺ Th1 dan sel T CD8⁺ (seperti TNF- α , IFN- γ , dan IL-6). Sebaliknya, *S. mutans* meningkatkan produksi sitokin anti-inflamasi dari Th2 seperti IL-10. IL-10 yang aktif berfungsi menghambat aktivasi makrofag untuk menghasilkan mediasi inflamasi seperti IL-1, IL-6, IL-12, dan TNF. Keadaan ini bila dibiarkan dalam waktu tertentu, akan menyebabkan terjadinya karies gigi. Karies gigi secara bertahap akan merusak jaringan pada gigi baik enamel, dentin, sementum atau sampai ke pulpa. Apabila sudah sampai ke pulpa menjadi pulpitis, maka kemungkinan besar bisa menyerang syaraf gigi dan penyakit bersifat sistemik.

Pemberian kefir susu kuda Sumbawa diharapkan dapat meningkatkan sel imun dalam tubuh sehingga ketika bakteri *Streptococcus mutans* masuk ke dalam tubuh beserta faktor pendukung lainnya, mampu melawan dan mengurangi terjadinya kerusakan jaringan dengan mempertahankan produksi sitokin pro-inflamasi yang tinggi dan menurunkan produksi sitokin anti-inflamasi.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka konsep yang telah dijelaskan, maka hipotesis pada penelitian ini adalah sebagai berikut: Pemberian kefir susu kuda Sumbawa memiliki efek preventif yang ditandai dengan peningkatan produksi TNF- α - Gr1 dan penurunan produksi IL-10 – T CD₄ pada mencit yang diinduksi *Streptococcus mutans*.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Tahapan penelitian dilaksanakan di beberapa laboratorium, antara lain: pembuatan kefir susu kuda Sumbawa di Laboratorium Mikrobiologi FKH Universitas Brawijaya, kultur bakteri *Streptococcus mutans* di Laboratorium Mikrobiologi FK Universitas Brawijaya, pemberian perlakuan pada hewan coba di Klinik FKH Universitas Brawijaya, pengambilan sampel glandula saliva hewan coba di Laboratorium Anatomi Veteriner FKH Universitas Brawijaya, serta uji produksi TNF- α – Gr1 dan IL-10 – T CD₄ menggunakan metode *flowcytometry* (FACS) di Laboratorium Fisiologi Hewan FMIPA Universitas Brawijaya. Penelitian berlangsung selama \pm 4 bulan pada bulan Agustus hingga November 2015.

4.2 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain: kandang mencit, tempat pakan dan minum mencit, mikropipet, pipet tetes, yellow tip, blue tip, spuit 1 cc, spuit 3 cc, apendorf, cawan petri, tabung sentrifuse, sentrifuse, box ice dan dry ice, incubator, beaker glass 500 ml, glove, masker, pinset anatomis, gunting tajam-tumpul, haemocytometer, mikroskop cahaya, FCM tube, *Becton-Dickson Fluorescence-Activated Cell Sorting* (FACS) caliber *flowcytometer*, dan *Flowcytometer*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain: mencit (*Mus musculus*) strain Balb/c jantan berumur 1,5 bulan (lepas sapih), pakan pellet, air mineral, sekam, suspensi Mc. Farland *Streptococcus mutans*, susu kuda Sumbawa, starter kefir, alkohol 70%, aquades, PBS (*Phosphate Buffer Saline*), ampicillin, larutan sukrosa 5%, Media BHIB, media TYC, evan blue, cytofix buffer, washperm buffer, dan desinfektan.

4.3 Sampel Penelitian

Kriteria hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus*) strain Balb/c, jantan, berumur $\pm 1,5$ bulan (lepas sapih), dengan rata-rata bobot badan 20-30 gram yang telah mendapatkan sertifikat laik etik No. 423-KEP-UB dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya. Banyaknya pengulangan yang diperlukan dalam penelitian dihitung dengan menggunakan rumus (Kusriningrum, 2008) sebagai berikut:

$$p(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan:

p = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah minimal ulangan yang diperlukan

Berdasarkan hasil perhitungan di atas, maka untuk 5 kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 4 dalam setiap perlakuan, sehingga jumlah mencit yang digunakan adalah 20 ekor. Kelompok perlakuan terdiri dari kontrol negatif (K -), kontrol positif (K +), perlakuan dosis 1 (P1), perlakuan dosis

2 (P2), dan perlakuan dosis 3 (P3). Hewan coba belum pernah digunakan dalam penelitian sebelumnya dan dalam kondisi sehat yang dapat diamati secara fisik seperti tidak cacat, mata bersinar, rambut mengkilap, aktivitas lincah, dan nafsu makan minum yang baik.

4.3.1 Penetapan Dosis Kefir Susu Kuda Sumbawa

Penetapan dosis kefir susu kuda Sumbawa yang digunakan merupakan hasil modifikasi dari penelitian sebelumnya yang menggunakan kefir susu kuda untuk terapi pada manusia dengan dosis 100ml/ hari (Ghasempour *et al.*, 2014). Dosis tersebut kemudian dikonversikan pada bobot badan mencit menggunakan metode dari Sugiharti dan Kartini (2007), menjadi 0,25 ml. Dalam penelitian ini digunakan dosis kefir susu kuda Sumbawa dengan kelipatan 2 dari dosis hasil perhitungan, sehingga didapatkan tingkatan dosis sebagai berikut: 0,1 ml, 0,25 ml, dan 0,5 ml per ekor mencit tiap 1 hari.

4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental *post test only control design* dengan analisis secara statistik menggunakan model Rancangan Acak Lengkap (RAL). Jumlah sampel yang tersedia dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan dimana masing-masing kelompok perlakuan mendapat pengulangan sebanyak 4 kali. Kelompok perlakuan 1 adalah mencit sehat tanpa perlakuan (kontrol negatif), kelompok perlakuan 2 adalah mencit yang diinfeksi dengan *Streptococcus mutans* dan ditambah sukrosa 5% (kontrol positif), serta kelompok perlakuan 3-5 adalah mencit yang diberikan kefir susu kuda Sumbawa dengan dosis masing-masing 0,1

ml, 0,25 ml, 0,5 ml yang diinfeksi *Streptococcus mutans* dan ditambah sukrosa 5%. Adapun rincian pembagian kelompok perlakuan penelitian sebagai berikut:

Tabel 4.1 Rancangan penelitian

No.	Kelompok	Perlakuan
1	Kontrol negatif (K-)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Diberi ampicillin selama 3 hari berturut-turut. ▪ Diberi pakan dan minum tanpa penambahan sukrosa 5% dan induksi <i>Streptococcus mutans</i>.
2	Kontrol positif (K+)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Diberi ampicillin selama 3 hari berturut-turut. ▪ Induksi bakteri <i>Streptococcus mutans</i> 4×10^9 CFU/ml per ekor mencit selama 5 hari pada permukaan gigi dan rongga mulut. ▪ Diberi pakan dan minum yang ditambah sukrosa 5% selama 14 hari.
3	Dosis 0,1 ml (P1)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Diberi ampicillin selama 3 hari berturut-turut. ▪ Diberi kefir susu kuda Sumbawa 0,1 ml/ hari setiap ekor mencit selama 14 hari dengan di swab di permukaan gigi dan rongga mulut. ▪ Induksi bakteri <i>Streptococcus mutans</i> 4×10^9 CFU/ml per ekor mencit selama 5 hari pada permukaan gigi dan rongga mulut. ▪ Diberi pakan dan minum yang ditambah sukrosa 5% selama 14 hari.
4	Dosis 0,25 ml (P2)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Diberi ampicillin selama 3 hari berturut-turut. ▪ Diberi kefir susu kuda Sumbawa 0,25 ml/ hari setiap ekor mencit selama 14 hari dengan di swab di permukaan gigi dan rongga mulut. ▪ Induksi bakteri <i>Streptococcus mutans</i> 4×10^9 CFU/ml per ekor mencit selama 5 hari pada permukaan gigi dan rongga mulut. ▪ Diberi pakan dan minum yang ditambah sukrosa 5% selama 14 hari.
5	Dosis 0,5 ml (P3)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Diberi ampicillin selama 3 hari berturut-turut. ▪ Diberi kefir susu kuda Sumbawa 0,5 ml/ hari setiap ekor mencit selama 14 hari dengan di swab di permukaan gigi dan rongga mulut. ▪ Induksi bakteri <i>Streptococcus mutans</i> 4×10^9 CFU/ml per ekor mencit selama 5 hari pada permukaan gigi dan rongga mulut. ▪ Diberi pakan dan minum yang ditambah sukrosa 5% selama 14 hari.

4.5 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

Variabel bebas : Dosis kefir susu kuda Sumbawa.

Variabel tergantung : Produksi TNF- α – Gr1 dan IL-10 – T CD₄.

Variabel kendali : Homogenitas: strain mencit, bobot badan mencit, umur dan jenis kelamin mencit, bakteri *Streptococcus mutans*, sukrosa 5%, ampicillin, dan kondisi kandang.

4.6 Tahapan Penelitian

4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Sebelum dilakukan percobaan, mencit di aklimatisasi selama 7 hari di dalam kandang yang masing-masing berisi 4 ekor tikus. Lantai kandang beralaskan sekam, lokasi kandang mencit berada pada tempat dengan suhu ruang (22-25°C), kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi udara cukup, bebas dari kebisingan, dan bebas dari polutan. Hewan coba diberi minum secara *ad libitum* dan pakan sebanyak 10% dari bobot badan tiap harinya. Setelah hari ke-7 aklimatisasi, sebelum perlakuan, mencit diberikan antibiotik ampicillin rutin selama 3 hari hasil modifikasi sebanyak 0,5ml/ekor yang diolesi secara langsung di permukaan gigi menggunakan spuit 1cc (**Lampiran 5**) untuk menekan pertumbuhan mikroba dalam rongga mulut (Ertugrul *et al.*, 2002 dan Takei *et al.*, 1994). Pemberian antibiotik merupakan titik nol dalam percobaan.

4.6.2 Pembuatan Kefir Susu Kuda Sumbawa

Cara pembuatan kefir menurut Safitri dan Swarastuti (2013) adalah dengan memasukkan 0,5% grain kefir dari total volume susu yang akan digunakan. Kemudian didiamkan dalam suhu ruang (22-25°C) sampai terfermentasi selama ± 24 jam. Pembuatan kefir susu kuda Sumbawa pada penelitian ini dibuat dengan memodifikasi cara sebelumnya, yaitu: memasukkan 50 gram grain kefir ke dalam 100ml susu kuda Sumbawa pada wadah tertutup tanpa dilakukan pasteurisasi terhadap susu kuda, lalu didiamkan selama ± 72 jam. Kefir susu kuda Sumbawa siap digunakan yang telah dilakukan pengukuran total BAL (bakteri asam laktat) $1,9 \times 10^6$ CFU/ml dan disimpan di dalam *refrigerator* pada suhu 4°C untuk menghambat proses fermentasi.)

4.6.3 Pembuatan Suspensi Bakteri *Streptococcus mutans*

4.6.3.1 Regenerasi Bakteri *Streptococcus mutans*

Bakteri *Streptococcus mutans* dilakukan peremajaan dengan memindahkan biakan bakteri murni yang didapatkan ke dalam media baru. Diambil 1 ose koloni bakteri lalu digoreskan pada 5ml media BHIA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam dengan 5% CO₂ (Madani, 2010).

4.6.3.2 Pembuatan Inokulum *Streptococcus mutans*

Biakan murni *Streptococcus mutans* yang telah diregenerasi diambil 2 ose, lalu di suspensikan dalam 100 ml media BHIB dan diinkubasi pada 5% CO₂ dengan suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya di buat pengenceran dengan mengambil 3 ml kultur biakan dimasukkan dalam 12 ml BHIB dan dihomogenisasi dengan vortex dan dihitung sebagai pengenceran pertama (10^{-1}).

Pengenceran dilakukan terus-menerus dengan cara yang sama sampai pengenceran 10^{-5} (Madani, 2010).

4.6.3.3 Pembuatan Suspensi *Streptococcus mutans*

Inokulum *Streptococcus mutans* sebanyak 2 ml dimasukkan dalam 20 ml media BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*) dan diinkubasi pada keadaan 5% CO_2 dengan suhu 37°C selama 18-24 jam. Selanjutnya diukur tingkat kekeruhan menggunakan spektrofotometer (Madani, 2010) dan jumlah sel yang digunakan disetarakan dengan 4×10^9 CFU. Untuk menghasilkan jumlah bakteri *Streptococcus mutans* 10^9 CFU, panjang gelombang yang digunakan disetarakan dengan 540 nm menggunakan *Optical Density* (OD) 1.0 (Rocha *et al.*, 2009).

4.6.3.4 Uji Pertumbuhan Biofilm *Streptococcus mutans*

Suspensi bakteri sebanyak 200 μL dimasukkan ke dalam *microplate* dan ditutup, lalu diinkubasi pada suhu 37°C dengan waktu bertingkat 24, 48, 72, dan 96 jam. Setelah diinkubasi, keluarkan *microplate* dan dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya dilakukan pewarnaan dengan *microplate* dimasukan dalam 200 μL larutan Kristal violet 1% dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Pewarna dicuci dengan air dan dibiarkan kering pada suhu ruang. *Microplate* yang kering dimasukkan 200 μL etanol 96% dan diinkubasi lagi selama 15 menit pada suhu ruang. Tahap akhir, *microplate* diukur menggunakan *microplate reader* pada densitas optik 595 nm (Fattah, 2015).

4.6.4 Isolasi Glandula Saliva

Hewan coba (mencit) di dislokasi terlebih dahulu, selanjutnya disemprot dengan alkohol 70% agar mengurangi terjadinya kontaminasi bakteri. Di insisi

daerah bagian leher atas untuk mengambil glandula saliva. Setelah menemukan glandula saliva, diambil dengan menggunakan pinset dan dimasukkan ke dalam tabung centrifuge 15 ml steril berisikan PBS, lalu dimasukkan dalam ice box untuk dipindahkan ke Laboratorium Fisiologi Hewan FMIPA Universitas Brawijaya untuk dilakukan uji *flowcytometry*.

4.6.5 Deteksi Produksi TNF- α – Gr-1 dan IL-10 – T CD4

Glandula saliva yang telah diisolasi dihaluskan terlebih dahulu. Diletakkan dalam cawan petri, yang berisi 5 ml PBS, digerus menggunakan pangkal spuit, disaring dan dimasukkan dalam tabung sentrifus. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit dengan suhu 4°C dan diambil peletnya. Pelet ditambahkan PBS 1 ml, dihomogenkan dengan cara pipeting. Kemudian diambil 100 μ l dimasukkan ke dalam tabung eppendorf (*microtube*) dan ditambahkan 100 μ l PBS, disentrifugasi kembali dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit dengan suhu 4°C. Supernatan dibuang dan diambil bagian peletnya (Rantam, 2013).

Deteksi Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) dan Interleukin 10 (IL-10) menggunakan metode *flowcytometry* yang melibatkan satu antibodi yang spesifik terhadap antigen tertentu. Setelah panen sel T dan sel granulosit dari glandula saliva maka ditambahkan antibodi, konjugat, dan pewarnaan spesifik. Pewarnaan intraseluler sel T dan sel granulosit difiksasi dan ditambahkan dengan *cytofix buffer* lalu diinkubasi selama 20 menit pada ruang gelap. Kemudian ditambahkan *washperm buffer* dan disentrifuse selama 5 menit dengan kecepatan 2500 rpm suhu 4° (Rantam, 2013). Tahap akhir, sampel tersebut ditambahkan

dengan 1 ml PBS (*Posphate Buffer Saline*) dan ditempatkan pada kuvet flowcytometer. Flowcytometer akan menghitung jumlah sel total serta jumlah sel yang terdeteksi oleh label antibody. Kemudian hasil yang diperoleh dianalisis *Becton-Dickson Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) calibur flowcatometer* (Pinca *et al.*, 2013).

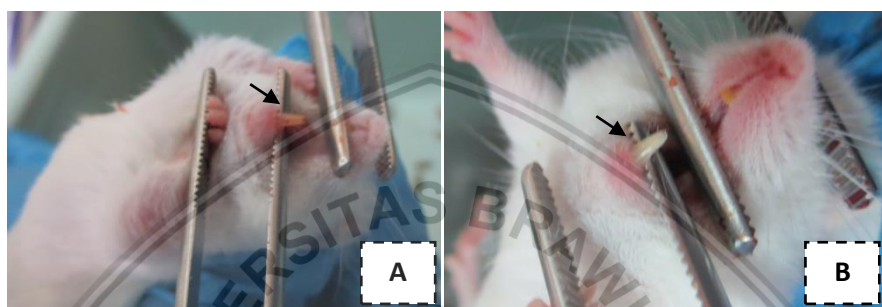
4.6.6 Analisa Data

Data yang diperoleh berupa produksi kuantitas dari sel hidup yang mengekspresikan Tumor Necrosis Factor-*alpha* (TNF- α) dan Interleukin 10 (IL-10). Selanjutnya analisa data dilakukan menggunakan metode *On-Way ANOVA (Analysis of Variance)* dengan CI 95% untuk melihat signifikasi pengaruh pemberian kefir susu kuda Sumbawa dengan menggunakan fasilitas SPSS (*Statistical Product of Service Solution*). Apabila terdapat perbedaan nyata uji maka dilanjutkan dengan perbandingan berganda uji *Turkey* atau Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan tingkat kepercayaan sebesar 95% ($\alpha = 0,05$).

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Gambaran Gigi Mencit yang Diinduksi *Streptococcus mutans*

Gambaran hasil induksi *Streptococcus mutans* pada hewan coba mencit yang telah dilakukan dapat dilihat pada Lampiran 8 dan Gambar 5.1 di bawah ini,

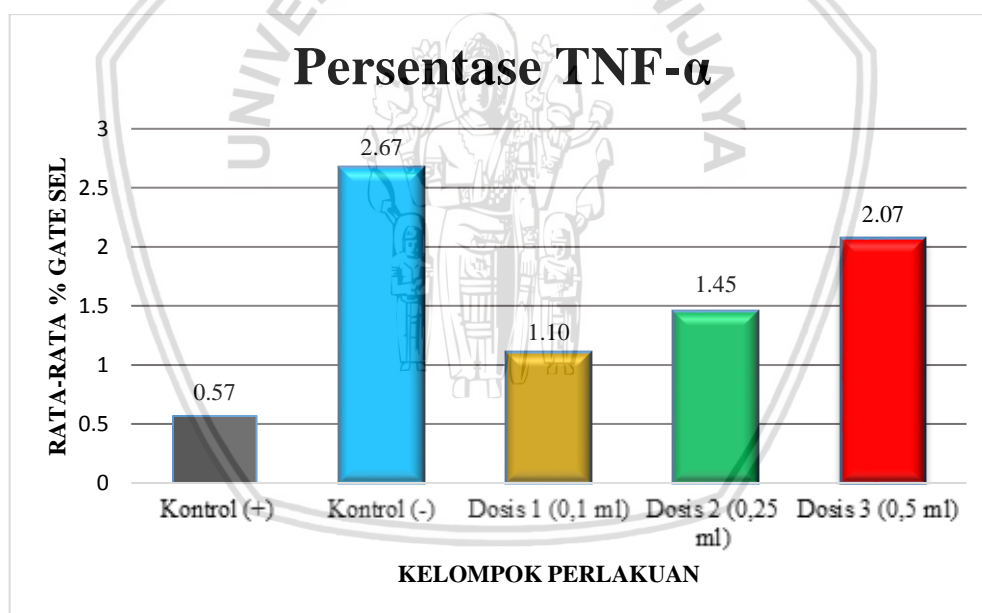


Gambar 5.1 Penampakan gigi terbentuk plak, A. Kontrol positif dan B. Kontrol negatif

Menurut Hale (2004), bahwa diagnosa karies gigi dapat diperhatikan melalui 5 tahap skoring perubahan patologi, yakni: 1) kerusakan gigi hanya pada enamel, 2) kerusakan gigi meluas ke dentin tetapi tidak mencapai ruang pulpa, 3) kerusakan gigi meluas sampai ke ruang pulpa, 4) kerusakan struktur gigi yang signifikan dari mahkota gigi, dan 5) mayoritas mahkota gigi hilang, terlihat lubang besar, dan yang tersisa adalah akar. Berdasarkan tahapan skoring tersebut dapat dilihat bahwa mencit A (kontrol positif) pada gigi incisivus mulai terbentuk plak yang berwarna kuning kecoklatan, dan meskipun tidak nampak pada gambar di atas, gigi molar pada mencit A terlihat adanya bintik hitam pada bagian oklusi, sedangkan kondisi gigi incisivus pada mencit B (kontrol negatif) terlihat bersih dan tidak ada terbentuknya plak.

5.2 Efek Pemberian Kefir Susu Kuda Sumbawa Terhadap Persentase TNF- α (*Tumor Necrosis Factor alpha*) yang Diproduksi oleh Gr-1

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok perlakuan dengan pemberian kefir susu kuda Sumbawa dari dosis yang semakin tinggi memiliki rata-rata yang meningkat. Sedangkan pada kelompok kontrol negatif yang dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (setelah diinduksi oleh *Streptococcus mutans*) menunjukkan bahwa persentase TNF- α mengalami peningkatan jumlah sel sebesar 2,1%. Grafik peningkatan jumlah persentase TNF- α dapat dilihat pada Gambar 5.3 berikut :



Gambar 5.2. Grafik Rataan Persentase Sitokin TNF- α – Gr1

Berdasarkan pengujian statistik menggunakan uji *one way* ANOVA (CI 95%) menunjukkan bahwa rata-rata perlakuan pemberian kefir susu kuda Sumbawa yang diinduksi *S. mutans* dapat meningkatkan jumlah persentase TNF- α dibandingkan dengan rata-rata kontrol positif yang hanya diinduksi oleh *Streptococcus mutans* tanpa ditambahkan kefir susu kuda Sumbawa secara

signifikan ($p < 0,05$). Pada hasil *post hoc* dengan uji Tukey didapatkan hasil bahwa kelompok kontrol memiliki perbedaan yang signifikan (berbeda nyata) dibandingkan kelompok perlakuan dengan ditunjukkan adanya perbedaan notasi dari setiap perlakuan. Akan tetapi dari 3 kelompok perlakuan dosis kefir, terlihat bahwa hanya kelompok dosis 3 yang signifikan dibandingkan dengan kelompok dosis 1 dan 2 yang sama-sama memiliki notasi (b), sedangkan perlakuan pemberian kefir susu kuda Sumbawa dosis 3 berada pada notasi (c) yang mendekati notasi kontrol negatif (d). Adanya perbedaan notasi pada kelompok perlakuan pemberian kefir susu kuda Sumbawa dosis 3 dan dibandingkan dengan kelompok kontrol positif maupun negatif, menunjukkan bahwa dosis 3 memberikan pengaruh yang signifikan terhadap jumlah persentase TNF- α seperti yang ditunjukkan pada tabel 5.2 berikut.

Tabel 5.2. Hasil Perbandingan Produksi TNF- α – Gr1 Antar Kelompok Perlakuan

Kelompok Perlakuan	Produksi TNF- α (%) \pm SD
Kontrol (+)	0,57 \pm 0,20 ^a
Kontrol (-)	2,67 \pm 0,28 ^d
Dosis 1 (0,1 ml)	1,10 \pm 0,22 ^b
Dosis 2 (0,25 ml)	1,45 \pm 0,28 ^b
Dosis 3 (0,5 ml)	2,07 \pm 0,22 ^c

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan adanya pengaruh yang berbeda nyata ($p < 0,05$) antar kelompok perlakuan

Pada tabel di atas terlihat bahwa rata-rata persentase TNF- α kontrol positif lebih rendah dibandingkan kontrol negatif, yang menandakan bahwa *Streptococcus mutans* bersifat sebagai immunosupresan. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Okahashi *et al.*, (2013) yang mengatakan bahwa hidrogen peroksida

yang dihasilkan oleh infeksi *S. mutans* penyebab karies gigi menyebabkan neutrofil mengalami apoptosis.

Neutrofil merupakan sel darah putih (leukosit) yang berperan dalam garis pertahanan tubuh pertama terhadap benda asing, salah satunya adalah bakteri *Streptococcus mutans*. Sebanyak 98% leukosit yang berperan sebagai komponen antimikroba dalam saliva adalah neutrofil. Neutrofil menyerang bakteri dan menghancurkannya dengan fagositosis melalui reaksi biokimia yang kompleks dan melibatkan berbagai enzim dan senyawa kimia. Umumnya, neutrofil memfagositosis bakteri dan membunuhnya dengan proses degranulasi pada granula primernya (marker Gr-1). Granula primer pada neutrofil mengandung enzim-enzim hidrolitik dan senyawa bakterisidal yaitu lisozim, protein pengikat besi laktoferin, leukin, dan fagositin serta protein kationik yang mampu membunuh bakteri. Makrofag juga merupakan sel imun yang memiliki respon cepat terhadap patogen yang masuk akan tetapi perbedaannya dengan neutrofil adalah makrofag butuh distimulasi oleh sitokin seperti IFN- γ dan memiliki waktu hidup yang lebih panjang di jaringan (Roeslan, 2002; Walker, 2004).

Neutrofil yang mengalami apoptosis dan makrofag yang tidak teraktivasi tidak mampu menekan infeksi bakteri yang masuk sehingga bakteri mampu berkembang, menginfeksi lebih banyak dan menyebabkan penurunan produksi sitokin pro-inflamatori seperti TNF- α , IL-6, dan IL-1 β . Selain itu Higerd T.B., *et al* (1981) menyatakan bahwa *Streptococcus mutans* memproduksi protein CEP-Sm (*Crude Extracelullar Product – Streptococcus mutans*) yang berperan sebagai pelindung bakteri, dimana mampu menekan respon proliferasi terhadap

haemagglutinin dari sel mononuclear darah perifer dan respon imun primer, sehingga sel hospes mengalami imunosupresi.

Berdasarkan ketiga kelompok perlakuan dosis kefir susu kuda Sumbawa, peningkatan persentase TNF- α – Gr1 paling maksimal terjadi pada kelompok perlakuan dosis 3 (0,5 ml) dibandingkan dengan kelompok perlakuan dosis 1 dan dosis 2. Tetapi tidak dapat disebutkan bahwa dosis 0,5 ml merupakan dosis optimal dalam peningkatan jumlah persentase TNF- α karena tidak ditemukannya dosis toksik dari kelompok perlakuan. Selain itu peningkatan jumlah persentase TNF- α pada dosis 0,5 ml tidak melebihi peningkatan jumlah persentase TNF- α kontrol negatif dengan selisih perbedaan 0,60%. Sedangkan selisih persentase TNF- α kelompok dosis 3 dengan kontrol positif adalah 1,50%, yang menandakan bahwa pemberian kefir susu kuda Sumbawa dapat meningkatkan sistem imun pro-inflamasi.

Peningkatan persentase TNF- α – Gr1 setelah diberikan kefir susu kuda Sumbawa yang merupakan minuman probiotik, menandakan bahwa probiotik dapat mempengaruhi pertumbuhan biofilm dan mikroflora pada rongga mulut. Bakteri-bakteri probiotik (BAL) bekerja dalam lingkungan mulut berkompetisi dengan bakteri patogen untuk tempat melekat, produksi zat-zat antimikroba dan aktivasi serta regulasi respon imun hospes. Di antara berbagai macam BAL, *Lactobacillus casei* dilaporkan mampu menghambat pertumbuhan dari bakteri streptococcus, baik secara klinis maupun laboratoris. Kompetisi *L. casei* dengan *S. mutans* dalam mencari tempat perlekatan dan beragregasi dikatakan sebagai mekanisme utama grup bakteri ini menghambat perkembangan *S. mutans* pada

gigi (Achmad, 2012). Adanya perlawanan antara BAL yang dihasilkan dari kefir susu kuda Sumbawa dengan bakteri pathogen *Streptococcus mutans* sehingga mempengaruhi sistem imun dengan meningkatkan proliferasi splenosit sebagai akibat mitogen untuk sel T dan sel B. Probiotik juga berperan terhadap peningkatan produksi sitokin, sebagai contoh *Streptococcus thermophilus* akan meningkatkan produksi sitokin TNF- α dan IL-6 melalui makrofag yang teraktivasi, serta mampu meningkatkan efek fagositosis terhadap bakteri pathogen (Erickson and Hubbard, 2000).

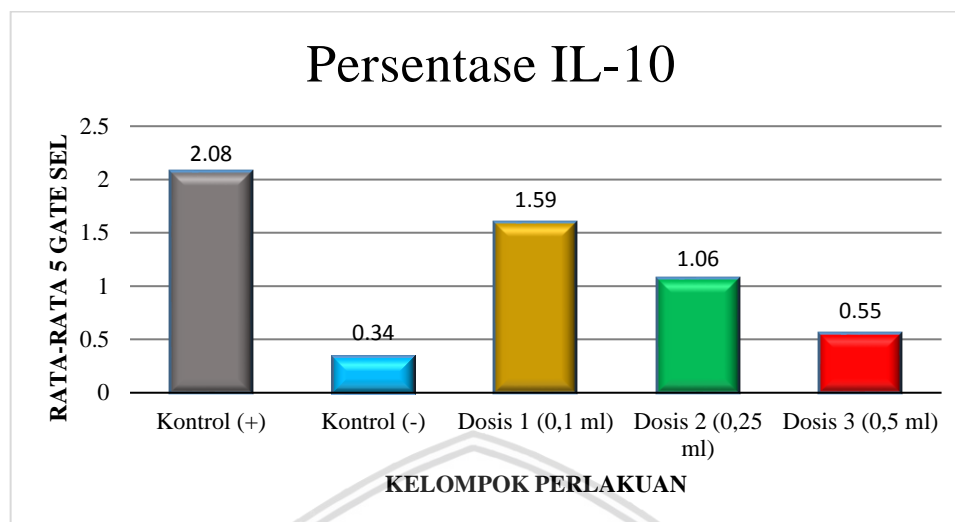
Meningkatnya ekspresi TNF- α yang diproduksi oleh neutrofil (Gr-1) menunjukkan bahwa pemberian kefir susu kuda Sumbawa memiliki efek imunostimulator dan mencegah terjadinya karies gigi. Peningkatan TNF- α pada perlakuan pemberian kefir susu kuda Sumbawa diduga disebabkan oleh kandungan bakteri asam laktat yang terkandung di dalamnya. Peningkatan TNF- α akan merangsang pertumbuhan diferensiasi sel B menjadi sel plasma untuk memproduksi antibodi. Antibodi dapat menghancurkan bakteri secara langsung dengan cara netralisasi. Pada saat netralisasi antibodi dapat mencegah toksin menembus sel sasaran (Bratawidjaja dan Rengganis, 2010).

Menurut Sofiyanti (2012), menyatakan bahwa bakteri asam laktat pada susu kuda Sumbawa mampu memulihkan fungsi neutrofil dan meningkatkan kapasitas reseptor yang dimiliki makrofag untuk meningkatkan produksi sitokin-sitokin yang diaktivasi oleh makrofag, salah satunya TNF- α . Menurut Perdigon *et al.* (1998), pemberian susu fermentasi yang mengandung salah satu bakteri *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei rhamnosus* secara *in vitro* dan *in*

vivo dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag peritoneum mencit. Hal ini didukung oleh beberapa penelitian yang menunjukkan bahwa bakteri asam laktat yang berperan sebagai probiotik memiliki kemampuan sebagai aktivator yang kuat untuk sistem imun alami karena mempunyai molekul spesifik pada dinding selnya. Dinding bakteri asam laktat tersusun atas *peptidoglycan* dan *lipotechoic acid* (Sofiyanti, 2012).

5.3. Efek Pemberian Kefir Susu Kuda Sumbawa Terhadap Persentase IL-10 (*Interleukin 10*) yang Diproduksi oleh Sel TCD₄

Hasil penelitian terhadap persentase IL-10 (*interleukin 10*) yang diproduksi oleh sel T limfosit (Th2) menunjukkan bahwa perlakuan pemberian kefir susu kuda Sumbawa pada dosis 3 (0,5 ml) mengalami penurunan jumlah persentase IL-10 yang signifikan dibandingkan dengan kelompok perlakuan dosis 1 (0,1 ml) dan dosis 2 (0,25 ml). Pada kelompok kontrol positif dibandingkan dengan kelompok negatif menunjukkan bahwa jumlah persentase IL-10 yang diproduksi sel T limfosit (Th2) dengan marker TCD₄ mengalami peningkatan jumlah sel sebesar 1,74%. IL-10 merupakan sitokin anti-inflamasi yang memiliki sifat berbanding terbalik dengan TNF- α , IL-6, dan IFN- γ yang merupakan sitokin pro-inflamasi. Adapun grafik penurunan IL-10 – TCD₄ dapat dilihat pada Gambar 5.3 di bawah ini.



Gambar 5.3. Grafik Rataan Persentase Sitokin IL-10 – TCD₄

Pada pengujian statistik menggunakan uji *one way* ANOVA (CI 95%) menunjukkan bahwa rata-rata perlakuan pemberian kefir susu kuda Sumbawa yang diinduksi *Streptococcus mutans* dapat menurunkan jumlah persentase IL-10 yang diproduksi oleh sel T limfosit (Th2) dibandingkan dengan rata-rata kontrol positif yang hanya diinduksi oleh *Streptococcus mutans* tanpa ditambahkan kefir susu kuda Sumbawa secara signifikan ($p < 0,05$). Hasil *post hoc* dengan uji Tukey menunjukkan bahwa antara kontrol negatif (a) dan kontrol positif (d) menunjukkan perbedaan yang nyata dengan adanya notasi yang berbeda. Pada kelompok perlakuan pemberian kefir susu kuda Sumbawa, menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan tiap perlakuan dosis, yakni kelompok dosis 1 dengan notasi (c), kelompok dosis 2 dengan notasi (b), dan kelompok dosis 3 dengan notasi (a). Akan tetapi hanya dosis 3 yang memiliki notasi sama dengan kontrol negatif, hal ini menandakan pemberian kefir susu kuda Sumbawa pada dosis 3 sebesar 0,5 ml mampu menghambat terbentuknya karies gigi. Hasil *post hoc* dengan uji Tukey dapat dilihat pada tabel 5.6 berikut.

Tabel 5.3 Hasil Perbandingan Produksi IL-10 Antar Kelompok Perlakuan

Kelompok Perlakuan	Produksi IL-10 \pm SD
Kontrol (+)	2,08 \pm 0,23 ^d
Kontrol (-)	0,34 \pm 0,16 ^a
Dosis 1 (0,1 ml)	1,59 \pm 0,26 ^c
Dosis 2 (0,25 ml)	1,06 \pm 0,21 ^b
Dosis 3 (0,5 ml)	0,55 \pm 0,22 ^a

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan adanya pengaruh yang berbeda nyata ($p < 0,05$) antar kelompok perlakuan

Pada dosis 1 (0,1 ml) terjadi penurunan jumlah persentase IL-10 yang diproduksi oleh sel T limfosit (Th2) dengan selisih persentase sebesar 0,49% dibandingkan dengan kontrol positif. Pada dosis 3 (0,5 ml) menunjukkan penurunan jumlah persentase IL-10 yang paling tinggi dibandingkan kontrol positif dengan selisih 1,53% yang memiliki perbedaan signifikan (berbeda nyata) ditandai dengan adanya perbedaan notasi. Namun kelompok perlakuan dosis 3 dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif tidak memiliki perbedaan signifikan (tidak berbeda nyata) ditandai dengan adanya notasi yang sama yakni notasi a, meskipun begitu jika dilihat secara deskriptif (gambar 5.6), menunjukkan adanya perbedaan dengan selisih 0,21%.

Hasil uji menunjukkan tidak adanya perbedaan yang nyata antara kelompok perlakuan dosis 3 dengan kelompok kontrol negatif berdasarkan hasil *post hoc* dengan uji Tukey dapat disebabkan karena jumlah sel T limfosit yang teraktivasi tidak dalam jumlah yang mencukupi untuk melakukan perlindungan terhadap infeksi *Streptococcus mutans*.

IL-10 adalah sitokin yang diproduksi oleh berbagai macam sel seperti Th2 (Limfosit T), sel dendritik, dan terutama makrofag yang aktif. IL-10 berperan

dalam mengontrol reaksi imun nonspesifik dan imun selular. Sel Th disebut juga sel *Tinducer* merupakan subset sel T yang diperlukan dalam induksi respons imun terhadap antigen asing. Antigen yang ditangkap, diproses dan dipresentasikan makrofag dalam konteks MHC-II ke sel CD4⁺. Sel CD4⁺ yang berproliferasi dan berdiferensiasi, berkembang menjadi subset Th1 dan Th2, mensintesis sitokin yang mengaktifkan sel imun lain seperti sel CD8⁺, sel B, makrofag dan sel NK. Sitokin yang diproduksi sel respon imun nonspesifik terhadap mikroba atau respon imun spesifik yang dini mempengaruhi diferensiasi sel CD4⁺ naif ke Th1 dan Th2. Diferensiasi sel CD4⁺ menjadi Th1 berperan dalam reaksi hipersensitivitas lambat dan mengarahkan makrofag. Diferensiasi sel CD4⁺ yang menjadi Th2 akan merangsang sel B untuk meningkatkan produksi antibodi (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).

IL-10 membawa efek pleiotropik, yaitu immunosupresan dan immunostimulan. Dua fungsi utama IL-10 adalah menghambat produksi beberapa jenis sitokin (TNF, IL-1, chemokine, dan IL-12), dan menghambat fungsi makrofag dan sel dendritik dalam membantu aktivasi sel T, utamanya Th1 dalam memproduksi IFN- γ , sehingga bersifat immunosupresi. Hambatan fungsi makrofag terjadi karena IL-10 menekan ekspresi molekul MHC II pada makrofag, dan mengurangi ekspresi ko-stimulator. Dampak akhir dari aktivitas IL-10 adalah hambatan reaksi inflamasi non-spesifik maupun spesifik yang diperantarai sel T, karena itu selain sebagai sitokin anti inflamatori, IL-10 juga disebut *cytokine synthesis inhibitory factor* (Kresno, 2010). Hal tersebut merupakan contoh dari regulator *feedback* negatif.

Berdasarkan studi Kresno (2013), bahwa IL-10 merupakan sitokin multifungsi yang penting. Peningkatan atau penurunan IL-10 disebabkan oleh adanya perbedaan genetik individu (hospes) untuk mengontrol keseimbangan antara inflamasi, humoral, dan infeksi mikroba. IL-10 akan menekan produksi MMP (*Metalloproteinase*), bersamaan meningkatkan sintesis inhibitor jaringan MMP di makrofag. IL-10 akan menjadi sitokin pelindung pada penyakit periodontal seperti karies gigi dan mengatur naik-turunnya sitokin pro-inflamasi. Individu (hospes) yang memproduksi IL-10 tinggi menandakan mengalami penyakit periodontal kronis karena sifatnya sebagai anti-inflamasi. Bakteri *Streptococcus mutans* memproduksi suatu protein CEP-Sm (*Crude Extracellular Product – Streptococcus mutans*) yang menekan imun non-spesifik hospes dan menginduksi produksi IL-10 lebih awal. Protein CEP-Sm ini mengikat reseptor IL-10 seluler dan menekan respon Th1 yang efektif terhadap bakteri intraseluler. Protein CEP-Sm ini mampu memanipulasi respon imun hospes yang membantu masa hidup pathogen (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010). Oleh sebab itu, respon imun diatur oleh peningkatan dan penurunan IL-10. Penurunan IL-10 akan meningkatkan respon imun (kekebalan tubuh) dengan meningkatkan sitokin pro-inflamasi (Rantam, 2013).

Kecenderungan karakteristik negatif antara sitokin pro-inflamasi (TNF- α) yang diproduksi oleh neutrofil (Gr-1) dengan sitokin anti-inflamasi (IL-10) yang diproduksi oleh Th2 (TCD₄) pada infeksi *Streptococcus mutans* menunjukkan adanya *counterpart* atau *cross regulation* antara keduanya. Sedangkan IL-10 sebagai sitokin sel T limfosit memiliki efek antagonis pada respon sitokin pro-

inflamasi dengan *down-regulating* produksi IL-10 sehingga menurunkan produksi sitokin pro-inflamasi dan aktivasi makrofag (Kresno, 2010).

Pada infeksi *S. mutans* produksi sitokin pro-inflamasi berperan penting dalam kekebalan terhadap karies gigi dengan menginisiasi terjadinya proses inflamasi untuk melindungi jaringan sekitar dari penyebaran inflamasi. Proses inflamasi terus berjalan sampai antigen dapat disingkirkan dan inflamasi akan pulih setelah mediator inflamasi diaktifkan. Inflamasi yang terjadi pada infeksi *S. mutans* merupakan inflamasi kronis. Inflamasi kronis terjadi apabila proses inflamasi akut mengalami kegagalan dan adanya antigen yang menetap (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010). Sehingga kondisi inflamasi yang kronis akibat infeksi *S. mutans* menyebabkan anti-inflamasi (IL-10 – TCD₄) meningkat dibandingkan pro-inflamatori (TNF- α - Gr1), karena sifatnya yang berbanding terbalik. Dengan pemberian probiotik kefir susu kuda Sumbawa terlihat dapat menurunkan produksi IL-10 sehingga produksi sitokin pro-inflamasi dapat meningkat, bekerja maksimal melawan bakteri pathogen yang masuk (*S. mutans*) dan membantu sel makrofag dan sel T limfosit dalam mengeleminasi bakteri dan memperbaiki jaringan dentin. Berdasarkan efek imunostimulator yang ditandai dengan peningkatan ekspresi TNF- α – Gr1 dan penurunan IL-10 – TCD₄ dari kefir susu kuda Sumbawa, maka dapat mencegah terbentuknya plak yang merupakan awal terbentuknya karies gigi.

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan perhitungan data, interpretasi hasil, dan pembahasan, dapat ditarik kesimpulan bahwa kefir susu kuda Sumbawa memiliki efek preventif yang dilihat dari respon imun yakni meningkatkan kadar TNF- α yang diproduksi oleh sel Gr-1 dan menurunkan kadar IL-10 yang diproduksi oleh sel T CD₄ optimal pada perlakuan dosis kefir susu kuda Sumbawa 0,5 ml.

6.2. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan rentangan dosis yang bervariasi sehingga dapat ditemukan dosis optimum kefir susu kuda Sumbawa yang dapat mencegah terjadinya karies gigi.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui aplikasi penggunaan kefir susu kuda Sumbawa yang tepat baik itu pada hewan ataupun manusia sebagai tindakan preventif karies gigi.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pillai, S.. 2014. Effector Mechanisms of T Cell-Mediated Immunity Functions of T Cells in Host Defense. *Basic Immunology: Functions and Disorders of The Immune System*. Philadelphia USA: Elsevier Saunders.
- Achmad, G.V. 2012. Jumlah Koloni *Streptococcus mutans* dalam Plak Anak Sebelum dan Sesudah Berkumur Minuman Probiotik [Tesis]. Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Indonesia.
- Akbar, B. 2010. Tumbuhan dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi Sebagai Bahan Antifertilitas. Adabia Press: Jakarta (6-7).
- Amano O., Mizobe K., Bando Y., and Sakiyama K. 2012. Anatomy and Histology of Rodent and Human Major Salivary Glands. *Japan Society of Histochemistry and Cytochemistry* 45(5): 241-250.
- Artaria, M.D. 2009. Antropologi Dental. Graha Ilmu: Yogyakarta (71-75).
- Baratawidjaja, K.G., dan Rengganis, I. 2010. Imunologi Dasar, Edisi ke-10. Fakultas Kedokteran UI Press: Jakarta.
- Berata, I.K. 2009. Mencit Balb/c Dapat Digunakan Sebagai Hewan Model Penelitian Virus Penyakit Jembrana. *Buletin Veteriner Udayana*, Vol. 1, No. 1: 7-11.
- Capaccio P., Monfort A., Moroni M., and Ottaviani F. 2002. Salivary Stone Lithoripsy in The HIV Patient. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics*, 93 (5): 525-527.
- Cogulu D., Onay H., Ozdemir Y., Aslan G.I., Ozkinay F., Kutukculer N., and Eronat C. 2015. Associations of Interleukin (IL)-1 β , IL-1 Receptor Antagonist and IL-10 with Dental Caries. *Journal of Oral Science*, Vol. 57, No. 1, 31-36.
- Colin, D. 2006. Why Does Supragingival Calculus Form Preferentially on the Lingual Surface of the 6 Lower Anterior Teeth. *J Can Dent Assoc* 72 (10): 923-926.
- Depamede S.N., Rosyidi A., Sriasih M., Dahlanuddin, Yulianti E., dan Suparman. 2014. Potensi Air Liur Sebagai Perantara dalam Pemeriksaan *Noninvasive* pada Hewan Piaraan. *Jurnal Veteriner*, Vol. 15, No 4: 564-569.
- Djamil, M.S. 2011. A-Z Kesehatan Gigi Panduan Lengkap Kesehatan Gigi Keluarga. Tiga Serangkai Pustaka Mandiri: Yogyakarta (91-95).

- Erickson K.L., and Hubbard N.E. 2000. Probiotic Immunomodulation in Health and Disease. *J Nutr* 2000: 403S-409S.
- Ertugrul F., Eltem R., and Ataman B.A. 2002. Bacteriological Effects of Xylitol and Different Carbohydrate Containing Diets in Swiss Albino Rats Inoculated with *Streptococcus mutans* CCUG 6519. *Turk J Med Sci*, 32 (13-19).
- Forssten S.D., Björklund M., and Ouwehand A.C. 2010. *Streptococcus mutans*, Caries, and Simulation Models. *Nutrients*, 2, 290-298.
- Ghasempour, M., Sefidgar, S.A., Moghadamnia, A.A., Ghadimi, R., Gharekhani, S., dan Shirkhani, L. 2014. Comparative Study of Kefir Yogurt-Drink and Sodium Fluoride Mouth Rinse on Salivary *Mutans Streptococci*. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, Vol. 15, No. 2 (214-217).
- Grönroos, L., Saarela, M., Mättö, J., Tanner-salo, U., and Vuorella, A. 1998. Mutacin Production by *Streptococcus mutans*. *Journal of Dentristry Medicine*, Vol. 5, No. 3 (19-25).
- Gupta, V., dan Gupta, B. 2010. Probiotic and Periodontal Disease: A current Update. *J. Oral heath comm. Dent.* 4(spl): 35-37.
- Hale, F.A. 2004. Dental caries in the dog. *Journal of Veterinary Dentistry*, Vol. 15: 79-83.
- Hamilton, R., Kasuba R., Zucker A., and Joyce, P. 2014. Cavities in Dogs. http://www.petmd.com/dog/conditions/mouth/c_multi_dental_caries?page=show#. [13 September 2015]
- Handajani, Supartinah, Marsetyawan, dan Asmara. 2006. Aktivitas Fagositosis Sel Makrofag Tikus Wistar Setelah Diinduksi Ekstrak Teh (*Camellia sinensis*) Konsentrasi 2 %. *Ind, J. Dent.* 13 (1): 7-8.
- Handayani, G.N. 2010. Imunomodulator. *Al-FIKR*, Vol. 14, No. 1.
- Hasan S., Danishuddin M., and Khan A.U. 2015. Inhibitory Effect of Zingiber officinale Towards *Streptococcus mutans* Virulence and Caries Development: in vitro and in vivo Studies. *BMC Microbiology* 15: 1.
- Hermawati, D., Sudarwanto, M., Soekarto, S.T., Zakaria, F.R., Sudarjat, S., dan Tjatur, R.F.S. 2004. Aktivitas Antimikroba Pada Susu Kuda Sumbawa. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, Vol. XV, No. 1 (47-53).
- Higerd, T.B., Regatta, Rd., Charleston, S.C., and Goust, J.M.C. 1981. Immunosupressive Extracelullar Product From Oral Bacteria. *Infection and Immunity* Vol.21, No. 2pp, 567-574.

- Holmstrom S.E., Bellows J., Juriga S., Knutson K., Niemiec B.A., and Perrone J. 2013. AAHA Dental Care Guidelines for Dogs and Cats. Veterinary Practice Guidelines 49: 2.
- Holt, J.G., N.R. Kneg, P.H.A. Sneath J.S. Haley and S.T. William. 1998. Bergey's Manual of Determinant Bacteriology, Ninth Edition. Wiliam and Wilkins A. Waterly Company, USA.
- Jawetz, Melnick, dan Adelberg's. 2004. Mikrobiologi Kedokteran, Ed 23. Penerbit Buku Kedokteran EGC: Jakarta (233-235).
- Konig, K.G., dan Hoogendorn, H. 1982. Prevensi dalam Kedokteran Gigi dan Dasar Ilmiahnya. Alih Bahasa: R.A. Tomasowa. Indonesia Dental Industrie: Jakarta (52-61).
- Kresno, S.B. 2013. Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium, Edisi Kelima. Fakultas Kedokteran UI Press: Jakarta.
- Kurnianto E., Sutapo, dan Setiatin E.T. 2001. Perkembangbiakan dan Penampilan Mencit Sebagai Hewan Percobaan. *Laporan Penelitian*, Fakultas Peternakan. Universitas Diponegoro.
- Kusriningrum. 2008. Perancangan Percobaan. Airlangga University Press: Surabaya.
- Kusumawati, N., Jenie, B.S.L., Setyahadi, S., dan Hariyadi, R.D. 2008. Aktivitas Antibakteri Laktobasili Asal Makanan Fermentasi Indonesia Terhadap Patogen Dan Pengaruhnya Terhadap Mikroflora Usus Tikus. *J. Obat Bahan Alam*, 7 (1): 69-75.
- Kusumawati, N., Widyastuti, S.K., dan Utama, I.H. 2014. Karakteristik Karang Gigi pada Anjing di Denpasar Bali. *Indonesia Medicus Veterinus*, Vol. 3, No.3 (223-229).
- Kylarr, M and Witter K. 2005. Prevalence of dental disorders in pet dogs. *Journal Vet. Med. – Czech*, Vol.50, No.11 (496–505).
- Lund, EM., Armstrong, PJ., and Kirk, CA. 1999. Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States. *J Am Vet Med Assoc*, 214 (1336–1341).
- Maksum, R. 2009. Mikrobiologi Kedokteran. Penerbit Buku Kedokteran EGC: Jakarta (153-154).
- Nasution, R.S. 2006. Imunologi Karies Gigi. Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Sumatera Utara.
- Nishimura, J., Saito, T., Yoneyama, H., Bai, L.L., Okumera, K., dan Isogai, E. 2012. Biofilm formation by *S.mutans* and related bacteria. *Advanced in Microbiology*, Vol. 2 : 208-7.

- Nomura R., Nakano K., Nemoto H., Fujita K., Inagaki S., Takahashi T., Taniguchi K., Takeda M., Yoshioka H., Amano A., and Ooshima T. 2006. Isolation and Characterization of *Streptococcus mutans* in Heart Valve and Dental Plaque Specimens From A Patient With Infective Endocarditis. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 1135-1140.
- Nurliyani, Artama W.T., dan Noor Z. 2005. Respon Antibodi dan Aktivitas Fagositosis Makrofag Peritoneal Mencit yang Diberi Protein Susu Kuda Pasteurisasi dan Fermentasi. *Media Kedokteran Hewan*, Vol. 21, No. 2.
- Nurliyani, Prasetya Z., Wibawantari M.A., dan Indratiningsih. 2014. Karakteristik Yoghurt dan Kefir yang Diproduksi dari Susu Kuda. Prosiding Seminar Nasional, Fakultas Peternakan, Universitas Jenderal Soedirman. Purwokerto. 475-484.
- Nurliyani. 2003. Komposisi Kimia dan Profil Protein Susu Kuda pada SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). *Buletin Peternakan* Vol. 27 (2) : ISSN 0126-4400.
- Octiara, E., dan Budiardjo, S. 2008. *Streptococcus mutans*: Faktor Virulensi Dan Target Spesifik Vaksin. *Dentika Dental Journal*; Vol. 13, No.2 (180-5).
- Okahashi N., Nakata, M., Sumitomo, T., Terao, Y., and Kawabata, S. 2013. Hydrogen Peroxide Produced by Oral *Streptococci* Induces Macrophage Cell Death. *Plos One* (5): 16.
- Ono, H., A. Obana, Y. Usami, M. Sakai, K. Nohara, H. Egusa, and T. Sakai. 2015. Regenerating Salivary Gland in the Microenvironment of Induced Pluripotent Stem Cells. *Biomed Research International*, 293570: 1-11.
- Pello B.C.S., Widyastuti S.K., dan Utama I.H. 2015. Bentuk Ujung Gigi Taring Pada Anjing yang Diberi Pakan *Dog Food*. *Indonesia Medicus Veterinus* 4(2): 148-154.
- Perdigon G., Macias M.E., Alvarez, S., and Olivr G. 1988. Systemic Augmentation of the Immune Respond in Mice by Feeding Fermented Milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Immunology*, 63: 17-23.
- Pieri, F.A., Dailbert, A.P.F., Bourguignon, E., dan Moreira, M.A.S. 2012. A Bird's-Eye View of Veterinary Medicine: Periodontal Disease in Dogs. InTech: Eropa (119-136).
- Pinca, S., Djati, M.S., dan Rifa'i, M. 2013. Analisis Mobilisasi Sel T CD4+ dan CD+8 pada Timus Ayam Pedaging Pasca Infeksi *Salmonella thypimuriumm* dan Pemberian Simplisia *Polycias obtuse*. *Jurnal penelitian*, (27-32).
- Rantam, F.A. 2013. Metode Imunologi. Airlangga University Press: Surabaya.

- Rocha S.S.d., Bernardi A.C., Pizzolitto A.C., Adabo G.L., and Pizzolitto E.L. 2009. *Streptococcus mutans* Attachment on a Cast Titanium Surface. *Materials Research*, Vol. 12, No. 1 (41-44).
- Roeslan, B.O. 2002. *Imunologi Oral (Kelainan di Dalam Rongga Mulut)*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Balai Penerbit: Jakarta.
- Rosidi, A., Haryani, S., dan Adiamayanti, E. 2013. Hubungan Antara Konsumsi Makanan Kariogenik Dengan Kejadian Karies Gigi Pada Anak SDN 1 Gogodalem Kec. Bringin Kab. Semarang. Angkatan Perawat Ngudi Waluyo Ungaran, Semarang.
- Safitri, M.F., dan Swarastuti, A. 2013. Kualitas Kefir Berdasarkan Konsentrasi Grain Kefir. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, Vol. 2, No. 2.
- Sofiyanti, R. 2012. Susu Kuda Sumbawa Meningkatkan Aktivitas Fagositosis dan Sekresi *Reactive Oxygen Intermediated* (ROI) Makrofag Mencit yang Dipapar Bakteri *Salmonella typhimurium*. *Jurnal Kesehatan Prima*, 6(1): 911-922.
- Stamatova I., and Meurman J.H. 2009. Probiotics: Health Benefits in The Mouth. *Am J of Dent*, 22 (6) : 329-338.
- Sugiharti R.J., dan Kartini N. 2007. Uji Toksisitas RadioFarmaka ^{99m}Tc -Etambutol Pada Mencit (*Mus musculus*). Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi Nuklir, PTNBR – BATAN. Bandung.
- Suhartanti D., dan Iqbal M. 2014. Perbandingan Aktivitas Antibakteri Kefir Susu Sapi dan Kefir Susu Kambing Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal EKOSAINS*, Vol. VI, No. 1.
- Sujaya I.N., Aryantini N.P.D., Nursini N.W., Cakrawati C.I.D., Juliasari N.L.M.E., Dwipayanti N.M.U., dan Ramona Y. 2012. Eksopolisakarida dari *Lactobacillus sp.* Isolat Susu Kuda Sumbawa dan Potensinya sebagai Prebiotik. *Jurnal Veteriner*, Vol. 12, No. 2 (136-144).
- Sujaya N., Ramona Y., Widarini NP., Suariani NP., Dwipayanti NMU., Nocianitri KA., dan Nursini NW. 2008. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Susu Kuda Sumbawa. *Jurnal Veteriner*, Vol. 9, No.2 (52-59).
- Surono, I.S. 2004. *Probiotik, Susu Fermentasi dan Kesehatan*. Tri Cipta Karya: Jakarta.
- Suzuki N., and Kurihara Y. 1998. Dental Caries Susceptibility in Mice is Closely Linked to The H-2 Region On Chromosome 17. *Caries Research*, 32, 262-265.

- Takei T., Aono W., Nagashima S., Yoshida T., Hashida T., Sobue S., and Ooshima T. 1994. Change of Salivary IgA Secretion and Caries Development in Irradiated Rats. *Journal of Dental Research*, 73: 1503.
- Tamin S., dan Yassi D. 2010. Penyakit Kelenjar Saliva dan Peran Sialoendoskopi untuk Diagnostik dan Terapi. *J. THT UI*: 1-16.
- Tjay T.H., dan Kirana R. 2007. Obat-obat Penting Khasiat, Penggunaan dan Efek-efek Sampingnya Edisi Keenam. Jakarta: Elex Media Komputindo.
- Utama I.H., Widyastuti S.K., dan Kartikasari C.D. 2017. Prevalensi dan Distribusi Plak Gigi pada Gigi Anjing (*Canin familiaris*) di Daerah Denpasar – Bali. *Indonesia Medicus Veterinus* 6(5): 378-385.
- Walker, D.M. 2004. Oral Mucosal Immunology: An Overview. *Annals Academy of Medicine*, Vol. 33 (Suppl) No.4.
- Walter A.B., Patricia C., Nicholas S., and Thomas C.H. 2003. Evidence of A Contribution of Genetic Factors to Dental Caries Risk. *J Evid Based Dent Pract*, 3 (4): 185-189.
- WHO. 2009. Milk Fluoridation for the Prevention of Dental Caries. Switzerland.
- Winarsih, Priosoeryanto, Lay, Wibawan, dan Kompiang. 2007. Pengaruh Probiotik Terhadap Fagositosis Polimorfonuklear Ayam Broiler. *J. Med. Vet. Indones*, 11 (2): 37-43.
- Worotijan, I., Mintjelungan, C.N., dan Gunawan, P. 2013. Pengalaman Karies Gigi Serta Pola Makan dan Minum Pada Anak Sekolah Dasar di Desa Kiawa Kecamatan Kawangkoan Utara. *Jurnal e-GiGi (eG)*, Vol. 1, No.1 (59-68).
- Yuniati H., dan Sahara E. 2012. Komponen Bioaktif Protein dan Lemak Dalam Susu Kuda Liar. *Buletin Penelitian Kesehatan*, Vol. 40, No. 2 (66-74).
- Zaenab, HW Mardiasuti, Anny VP., dan Logawa B. 2004. Uji Antibakteri Siwak (*Salvadora persica* Linn.) Terhadap *Streptococcus mutans* (ATC31987) Dan *Bacteroides melaninogenicus*. *Makara, Kesehatan*, Vol. 8, No.2, 37-40.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Keterangan Mencit dari Unit Pra-Klinik LPPT UGM



UNIVERSITAS GADJAH MADA
**LABORATORIUM PENELITIAN DAN PENGUJIAN TERPADU
(LPPT – UGM)**
Bidang Layanan Penelitian Pra – Klinik dan Pengembangan Hewan Percobaan
Jl. Agro Karang Malang Kampus UGM
Telp. (0274) 7497705, FAX. (0274) 546868, e-mail: lppt_info@mail.ugm.ac.id

SURAT KETERANGAN NO : 358/LP3HP/29/VIII/2015

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Dr. drh. Claude Mona Airin, MP.
NIP : 19760708 200801 2 012
Jabatan : Kabid Unit Pra Klinik – LPPT UGM.

Menerangkan bahwa ;

Nama : Intan Purnama Sari
NIM : 125130107111005
Instansi : Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang


Pada bulan Agustus 2015 membeli Mencit putih (*Mus musculus L.*) galur balb/c Jantan usia 1½ bulan sejumlah 50 (Lima puluh) ekor dari Unit Pra-Klinik LPPT Universitas Gadjah Mada.

Hewan tersebut dalam keadaan masih vertil dan tidak terinfeksi penyakit sehingga tidak menularkan penyakit. Menurut keterangan dari yang bersangkutan hewan tersebut akan dibawa ke Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang, Jawa Timur dan akan digunakan sebagai hewan percobaan Penelitian.


Demikian surat keterangan ini dibuat, agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Atas kerjasama yang baik diucapkan banyak terima kasih

Yogyakarta, 9 September 2015
Kabid Unit Pra- Klinik LPPT UGM


Dr. drh. Claude Mona Airin, MP.
NIP : 19760708 200801 2 012

Lampiran 2. Sertifikat Laik Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"**


No:423-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**

PENELITIAN BERJUDUL	: EFEK PREFENTIFPEMBERIAN KEFIR SUSU KUDA SUMBAWA TERHADAP KARIES GIGI HASIL INDUKSI STREPTOCOCCUS MUTANS BERDASAR RESPON IMUN (IL-6, IFN- γ , TNF-A, IL-10, S IGA, NEUTROFIL, TLR3, TLR4) PADA HEWAN COBA MENCIT <i>Mus musculus</i> Blab/c
PENELITI	: INTAN PURNAMA SARI
UNIT/LEMBAGA/TEMPAT	: UNIVERSITAS BRAWIJAYA
DINYATAKAN	: LAIK ETIK

Malang, 20 Oktober 2015
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya




Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001

NB : Nama yang tercantum pada sertifikat ini merupakan anggota peneliti

ANGGOTA PENELITI :

- | | |
|------------------------------|----------------------------|
| 1. Nisa Tazkiyah | NIM. 125130100111010 |
| 2. Yessie Sekti Putri P. | NIM. 125130107111003 |
| 3. Dr. Sri Murwani, drh., MP | NIP. 19630101 198903 2 001 |

Lampiran 3. Surat Keterangan *Streptococcus mutans* dari FKG UNAIR



KEMENTERIAN KESEHATAN RI

DIREKTORAT JENDERAL BINA UPAYA KESEHATAN

BALAI BESAR LABORATORIUM KESEHATAN SURABAYA

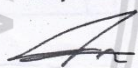
Jalan Karangmenjangan No. 18 Surabaya - 60286
 Telepon Pelayanan : (031) 5020306, TU : (031) 5021451 Faksimili : (031) 5020388
 Website : bblksurabaya.com : Surat elektronik : bblksub@yahoo.co.id

*Untuk Anda
Kami memberikan yang terbaik.*

HASIL PEMERIKSAAN MIKROBIOLOGI	
Nomor Lab : L14007988 / 285 N	Dokter : drg. Tutik
Jenis Bahan : Biakan	Alamat : FKG UNAIR
Diperiksa : Kultur secara automatic (Vitek 2)	Penderita : -
Diterima tgl. : 01-07-2014	Kelamin : - Umur : -
Selesai tgl. : 03-07-2014	Alamat : -

HASIL PEMERIKSAAN MIKROBIOLOGI

Kultur :
Hasil Terlampir

Pemeriksa :	Catatan	Manajer Teknis  dr. Nanang Abdul Ghafur NIP 198109232010121001
-------------	---------	---

Patient Name: _____ Patient ID: _____
 Location: _____ Physician: _____
 Lab ID: Strep. mutans Isolate Number: 1

Selected Organism : Streptococcus mutans

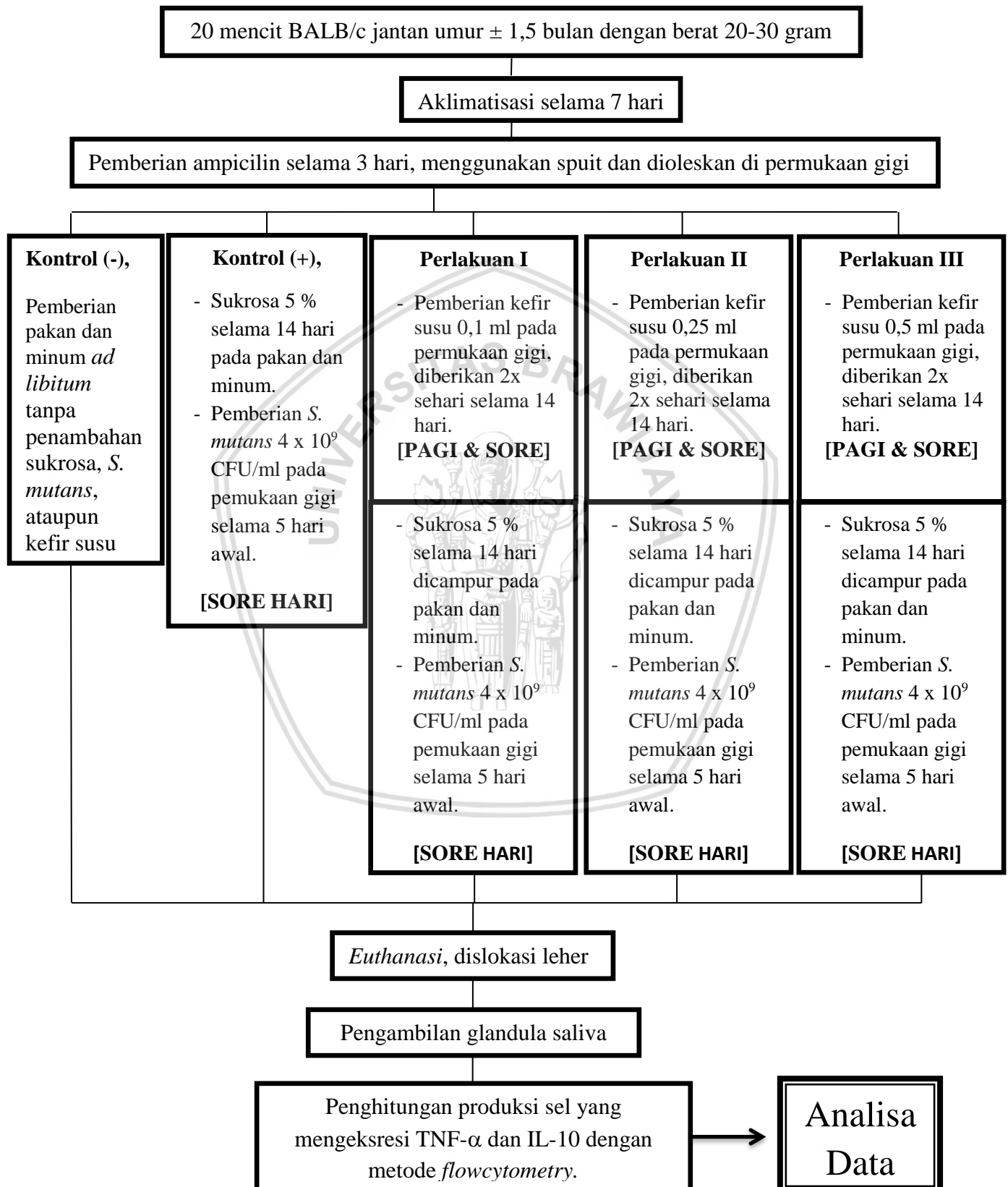
Source: _____ Collected: _____

Comments:	
-----------	--

Identification Information	Analysis Time: 6.00 hours	Status: Final
Selected Organism	96% Probability	Streptococcus mutans
Organism Quantity:	Bionumber:	140001164653531
ID Analysis Messages		

Biochemical Details																	
2	AMY	+	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADH1	-	9	BGAL	-	11	AGLU	+
13	APPA	-	14	CDEX	-	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	-
20	LeuA	(-)	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	+	26	PyrA	-	27	BGUR	-
28	AlaA	+	29	TyrA	-	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLYB	+	37	dGAL	+
38	dRIB	-	39	ILATk	-	42	LAC	+	44	NAG	-	45	dMAL	+	46	BACI	+
47	NOVO	+	50	NC6.5	-	52	dMAN	+	53	dMNE	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	dRAF	+	58	O129R	-	59	SAL	+	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	-
64	OPTO	+															

Lampiran 4. Skema Tahapan Penelitian



Lampiran 5. Perhitungan Dosis Kefir Susu Kuda Sumbawa dan Ampicilin

Tabel perbandingan luas permukaan tubuh hewan percobaan untuk konversi dosis

	Mencit (20 g)	Tikus (200g)	Kelinci (1.5 g)	Manusia (70 kg)
Mencit (20 g)	1,0	7,0	27,8	387,9
Tikus (200 g)	0,14	1,0	3,3	56,0
Kelinci (1.5 kg)	0,04	0,25	1,0	14,2
Manusia (70 kg)	0,0026	0,018	0,07	1,0

(Sumber: Sugiharti dan Kartini, 2007)

1) Perhitungan Dosis Kefir Susu Kuda Sumbawa

Faktor konversi manusia ke mencit adalah sebesar 0,0026. Dosis yang diberikan pada manusia menurut Ghasempour *et al.* (2014) adalah 100 ml/orang/ hari.

Perhitungan konversi:

$$100 \text{ ml} \times 0,0026 = 0,26 \text{ ml} \sim 0,25 \text{ ml}$$

Dosis yang digunakan dalam penelitian merupakan pembulatan kelipatan 2, yakni:

$$\text{Dosis 1: } 0,25 \text{ ml} / 2 = 0,125 \text{ ml} \sim 0,1 \text{ ml/ ekor/ hari}$$

$$\text{Dosis 2: } 0,25 \text{ ml/ ekor/ hari}$$

$$\text{Dosis 3: } 0,25 \text{ ml} \times 2 = 0,5 \text{ ml/ ekor/ hari}$$

2) Perhitungan Dosis Ampicilin

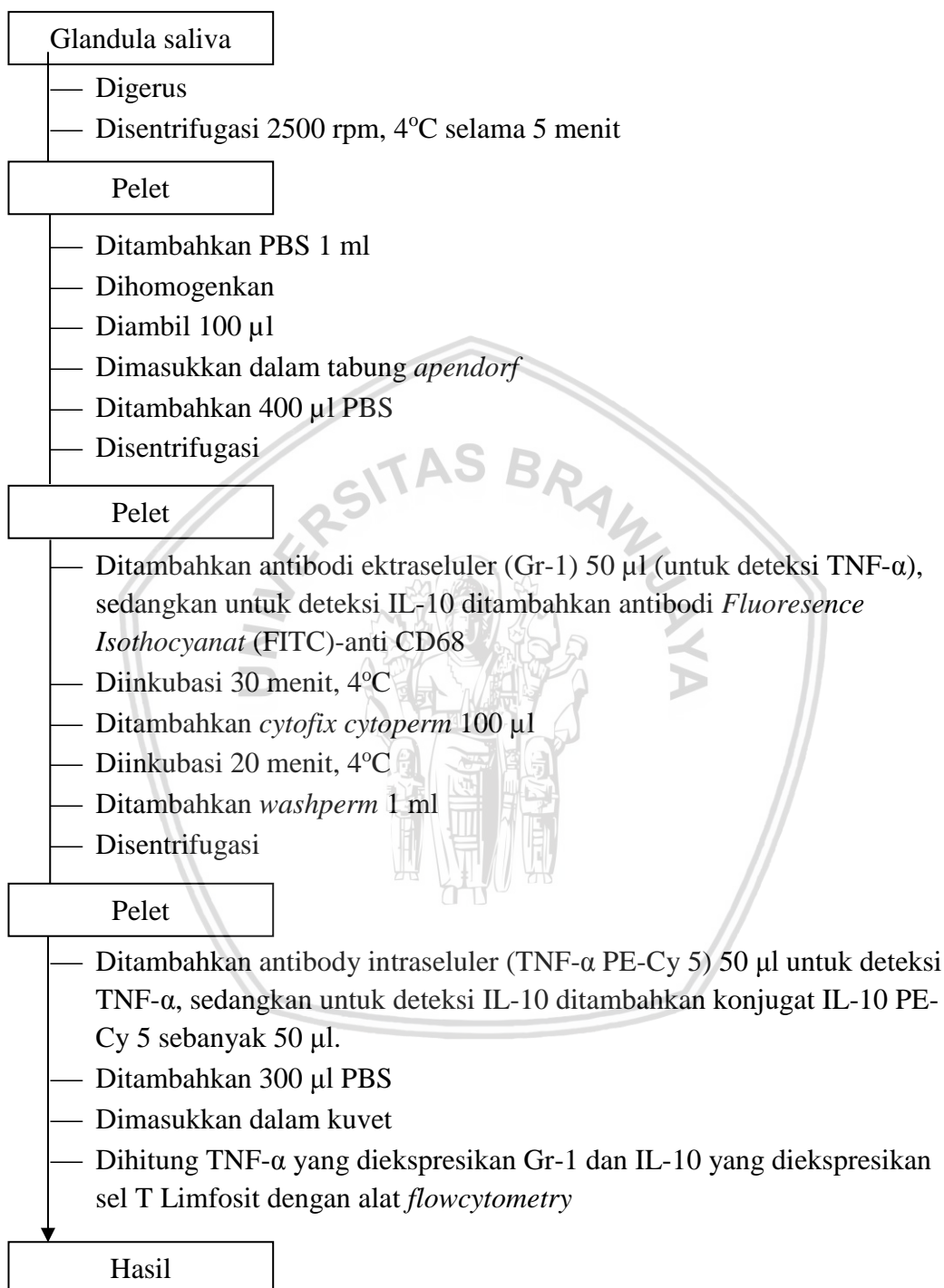
a. Dosis Ampicilin untuk pemberian oral 20 mg/Kg BB

Mencit dengan bobot 22 gr diperoleh dosis 0,022 mg/gBB ($\frac{22 \text{ gr}}{1000 \text{ gr}}$)

b. Konsentrasi Ampicilin dalam sediaan suspensi 1 mg/ml, maka banyaknya Ampicilin yang digunakan:

$$\frac{\text{Dosis} \times \text{BB}}{\text{Konsentrasi}} = \frac{0,022 \times 22}{1} = 0,484 \text{ ml} \sim 0,5 \text{ ml/ekor}$$

Lampiran 6. Diagram Alir Uji *Flowcytometry*



Lampiran 7. Hasil Uji Bakteri Asam Laktar dan TPC Kefir Susu Kuda
Sumbawa



KEPADA : Nisa Tazkiyah
FKH - UB
MALANG

LAPORAN HASIL UJI
REPORT OF ANALYSIS

Nomor / Number : 0312/THP/LAB/2016
 Nomor Analisis / Analysis Number : 0312
 Tanggal penerbitan / Date of issue : 28 April 2016
 Yang bertanda tangan di bawah ini menerangkan, bahwa hasil pengujian
 The undersigned ratifies that examination
 Dari contoh / of the sample (s) of : **KEFIR SUSU KUDA SUMBAWA**
 Untuk analisis / For analysis :
 Keterangan contoh / Description of sample :
 Diambil dari / Taken from :
 Oleh / By :
 Tanggal penerimaan contoh / Received : 14 April 2016
 Tanggal pelaksanaan analisis / Date of analysis : 14 April 2016
 Hasil adalah sebagai berikut / Resulted as follows :

PARAMETER	HASIL
TPC (CFU/ml)	4,0x10 ⁴
TOTAL BAL (CFU/ml)	1,9x10 ⁵

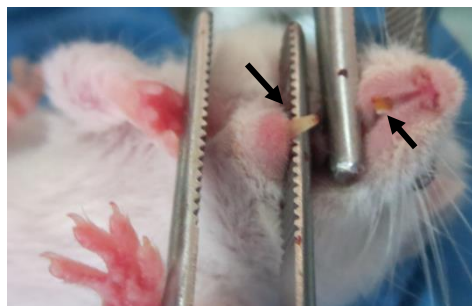
HASIL PENGUJIAN INI HANYA BERLAKU UNTUK
CONTOH-CONTOH TERSEBUT DI ATAS. PENGAMBIL
CONTOH BERTANGGUNG JAWAB ATAS KEBENARAN
TANDING BARANG

Ketua,

 Dr. Widya Dwi Rukmi P., STP, MP
 NIP. 19700504 199903 2 002

Lampiran 8. Dokumentasi Penelitian

KONTROL POSITIF



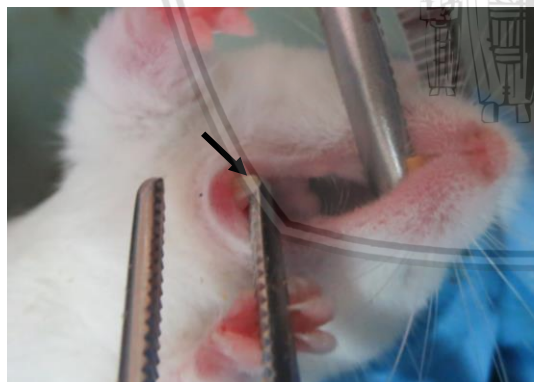
Tanda panah pada gigi incisivus atas dan bawah mencit kontrol positif terlihat berwarna kuning kecoklatan, dan meskipun tidak terlihat pada foto, pada bagian oklusi (permukaan) gigi molar mencit terdapat titik hitam yang merupakan lesi karies.

KONTROL NEGATIF

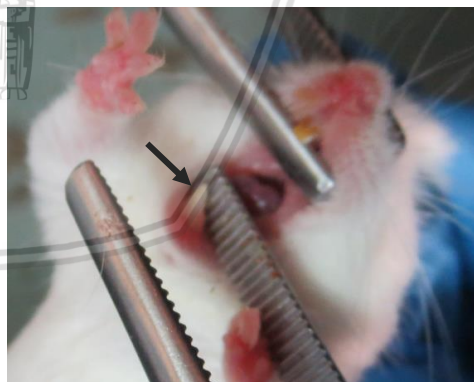


Tanda panah pada gigi incisivus mencit kontrol negatif terlihat berwarna putih bersih, dan tidak ditemukan titik hitam pada bagian oklusi gigi molar.

KEFIR 1



KEFIR 2



KEFIR 3

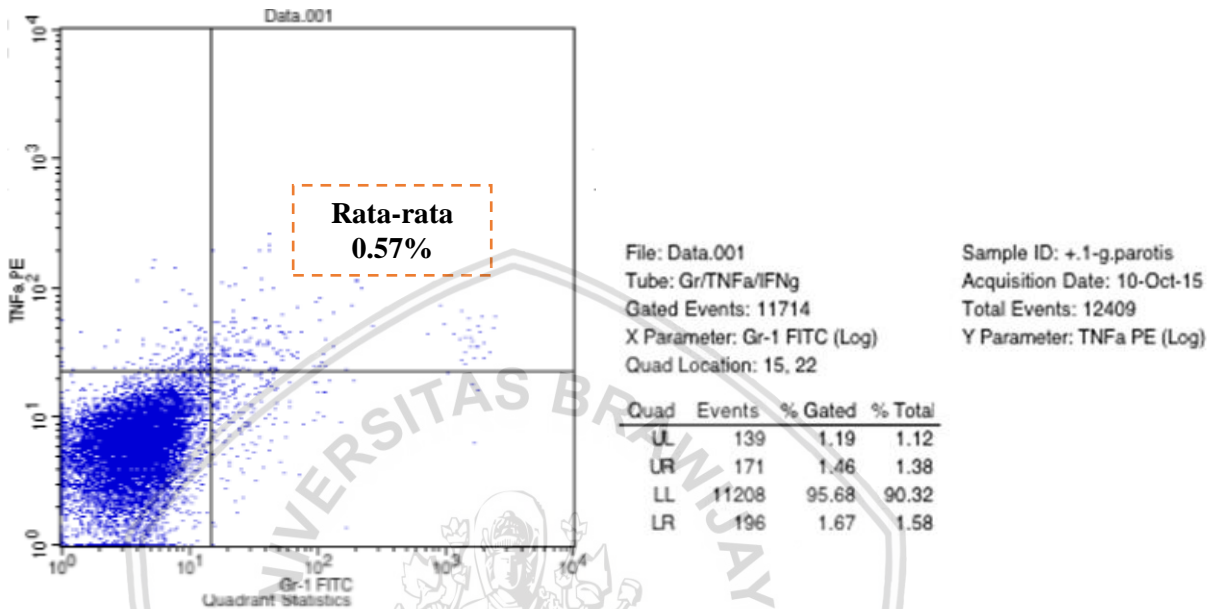


Berdasarkan tanda panah pada gigi incisivus pada kelompok mencit dengan dosis kefir 1,2, dan 3 terlihat bahwa semakin tinggi dosis kefir, maka warna gigi terlihat semakin putih bersih mendekati kelompok mencit kontrol negatif.

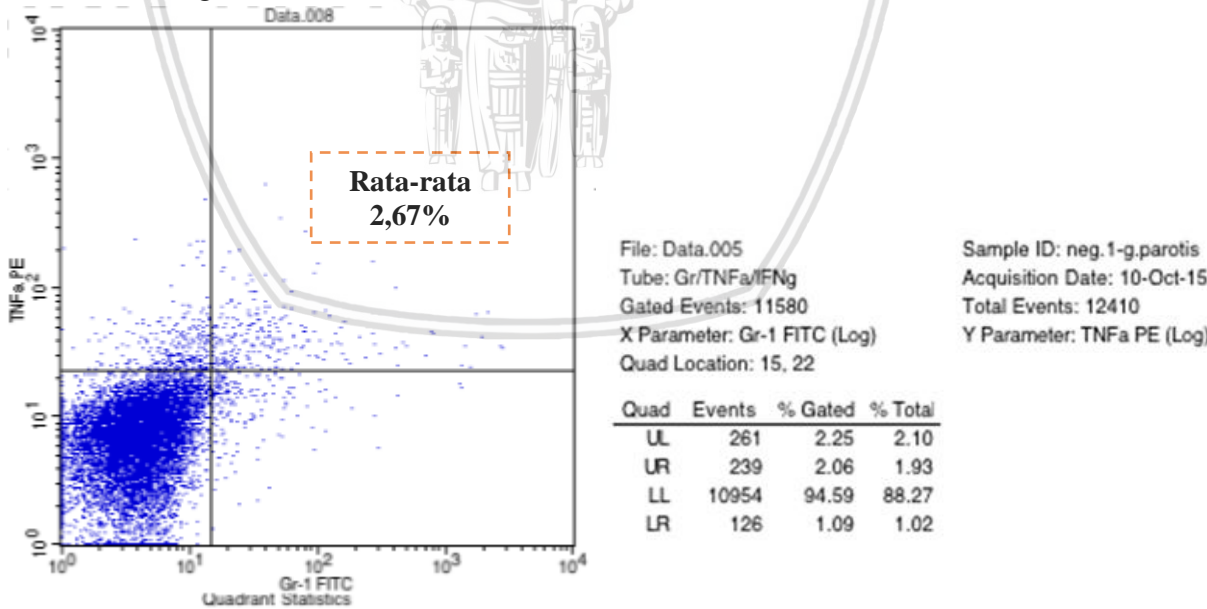
Lampiran 9. Hasil Uji *Flowcytometry*

TNF- α

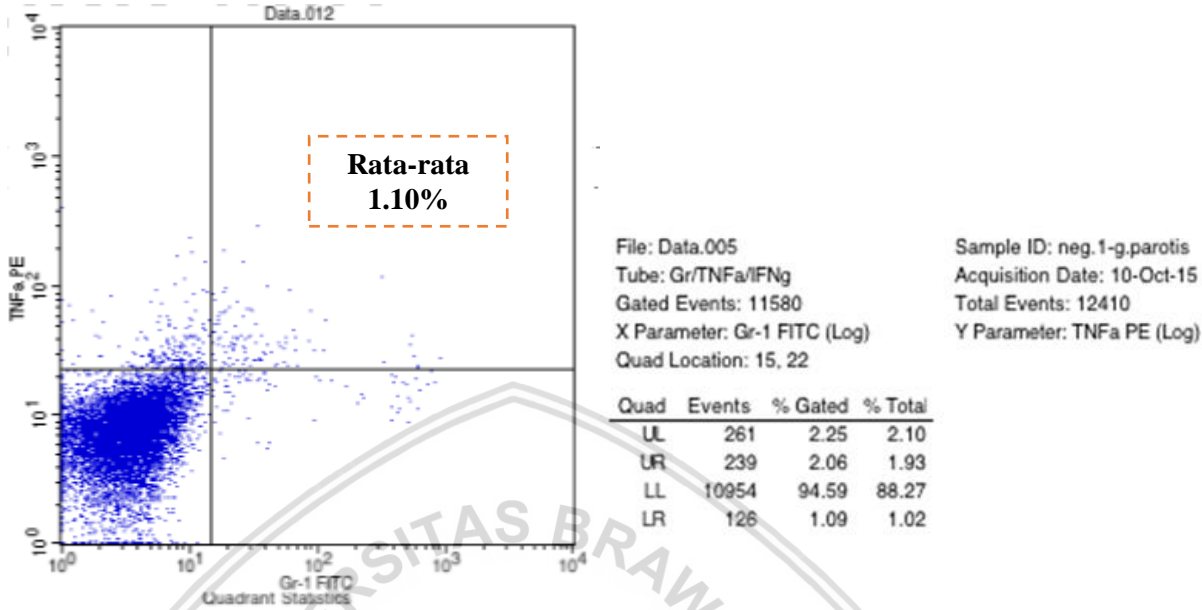
a. Kontrol positif



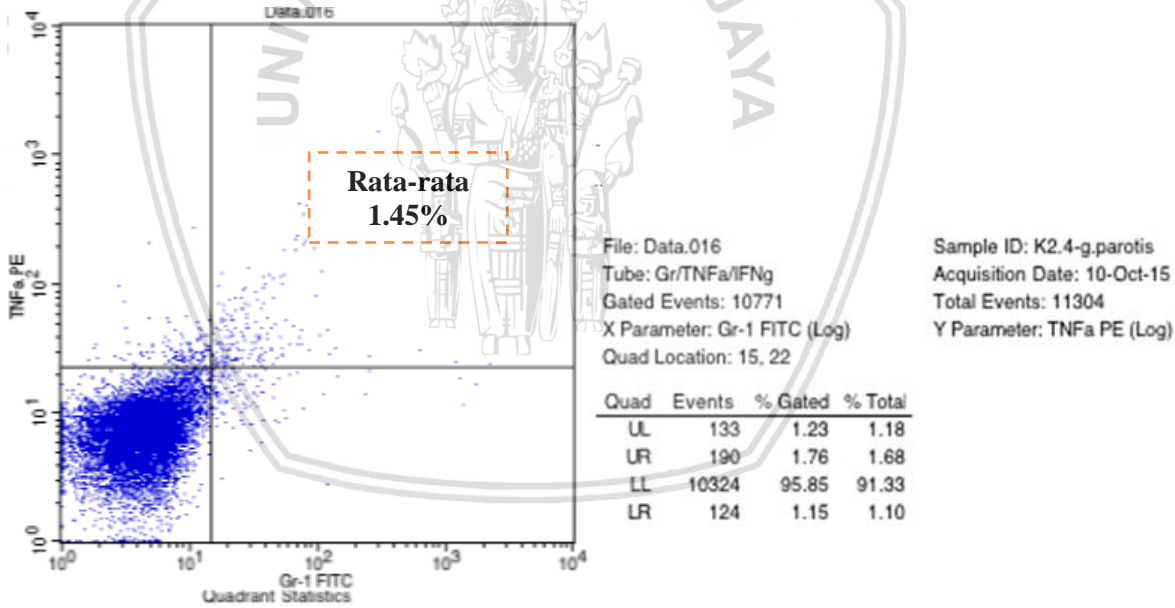
b. Kontrol negatif



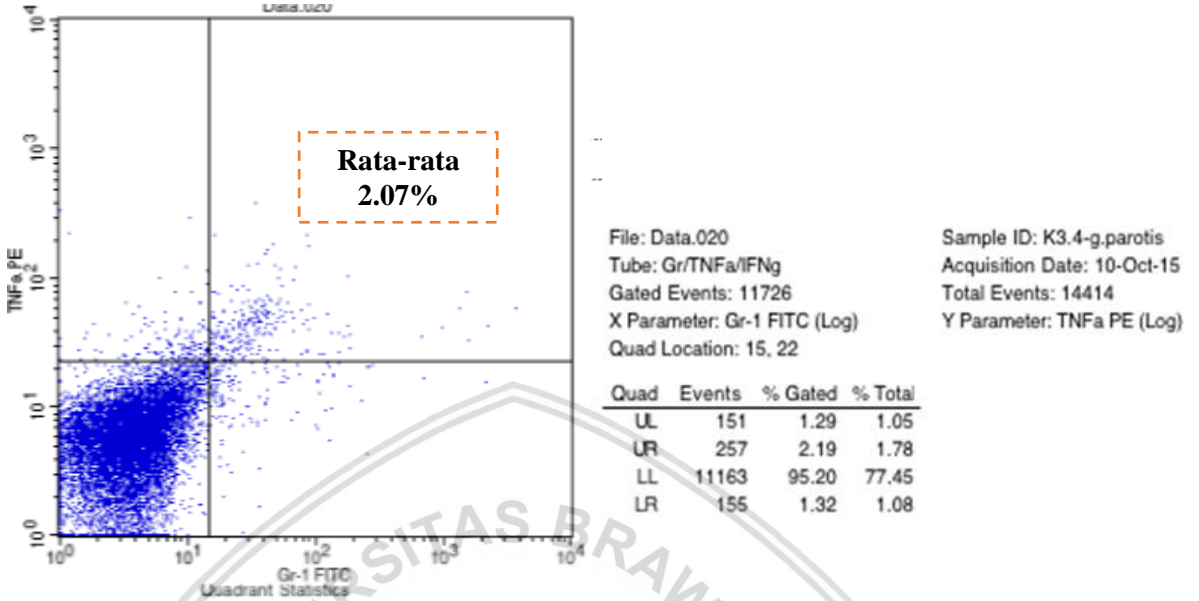
c. Dosis 0,1 ml



d. Dosis 0,25 ml

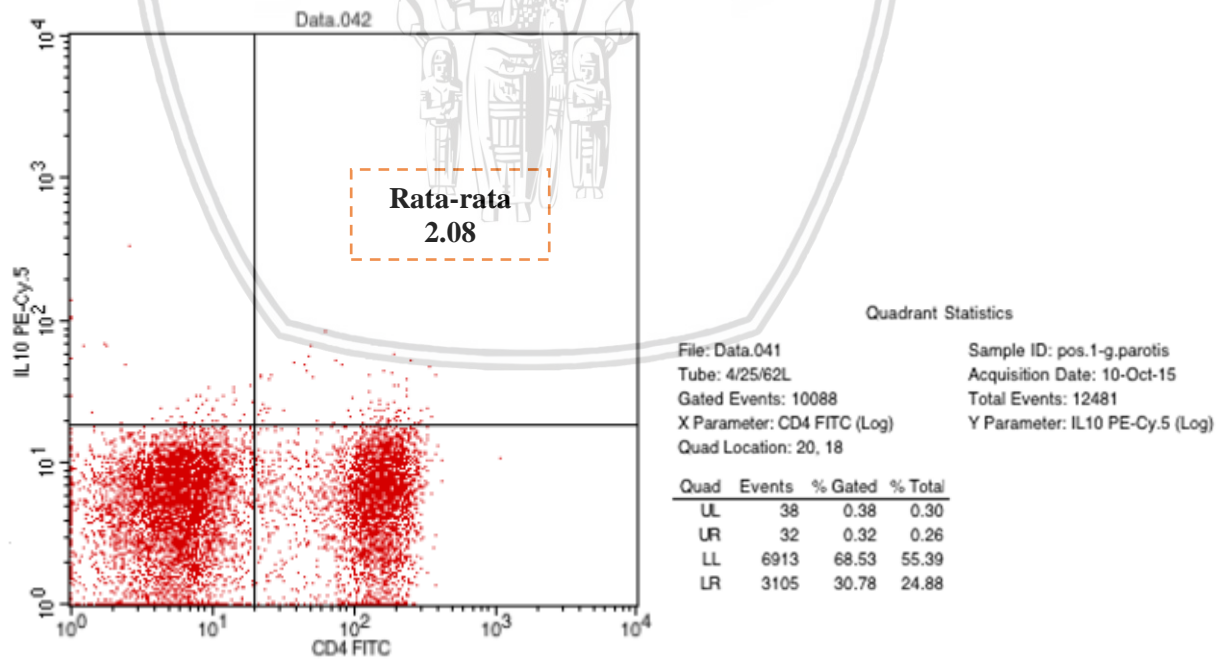


e. Dosis 0,5 ml

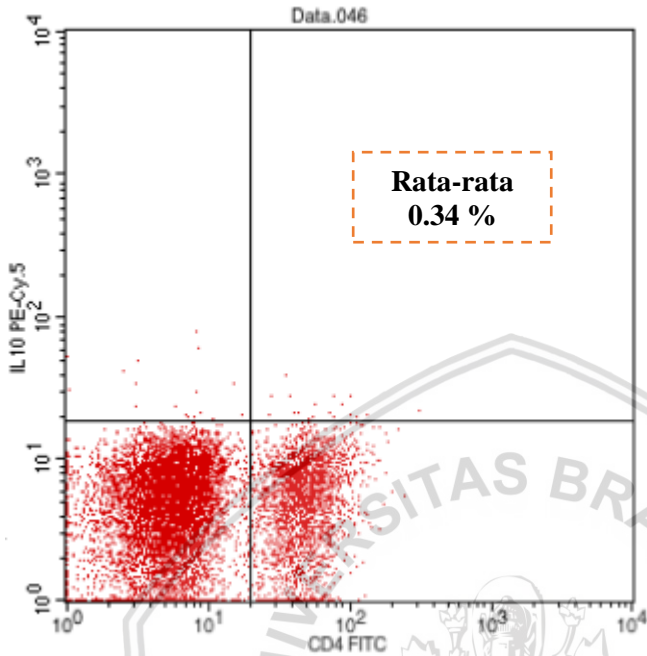


IL-10

a. Kontrol positif



b. Kontrol negatif



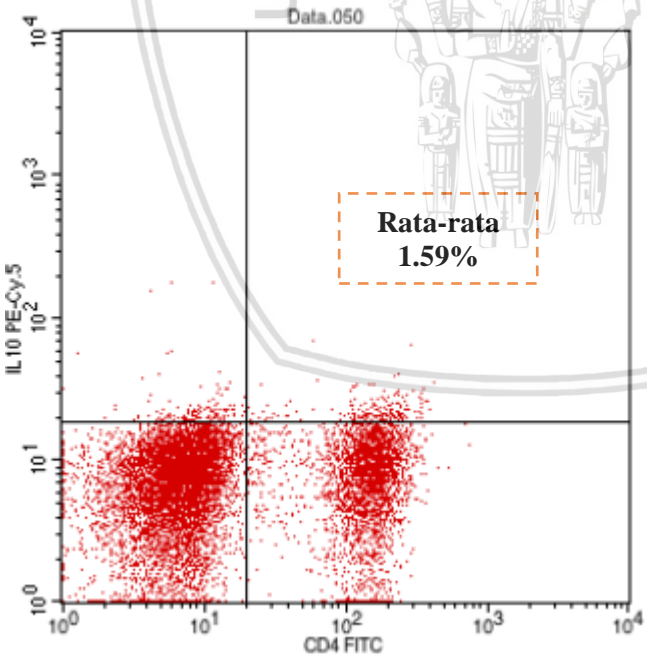
Quadrant Statistics

File: Data.045
Tube: 4/25/62L
Gated Events: 10109
X Parameter: CD4 FITC (Log)
Quad Location: 20, 18

Sample ID: neg.1-g.parotis
Acquisition Date: 10-Oct-15
Total Events: 12391
Y Parameter: IL10 PE-Cy.5 (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	22	0.22	0.18
UR	21	0.21	0.17
LL	7309	72.30	58.99
LR	2757	27.27	22.25

c. Dosis 0,1 ml



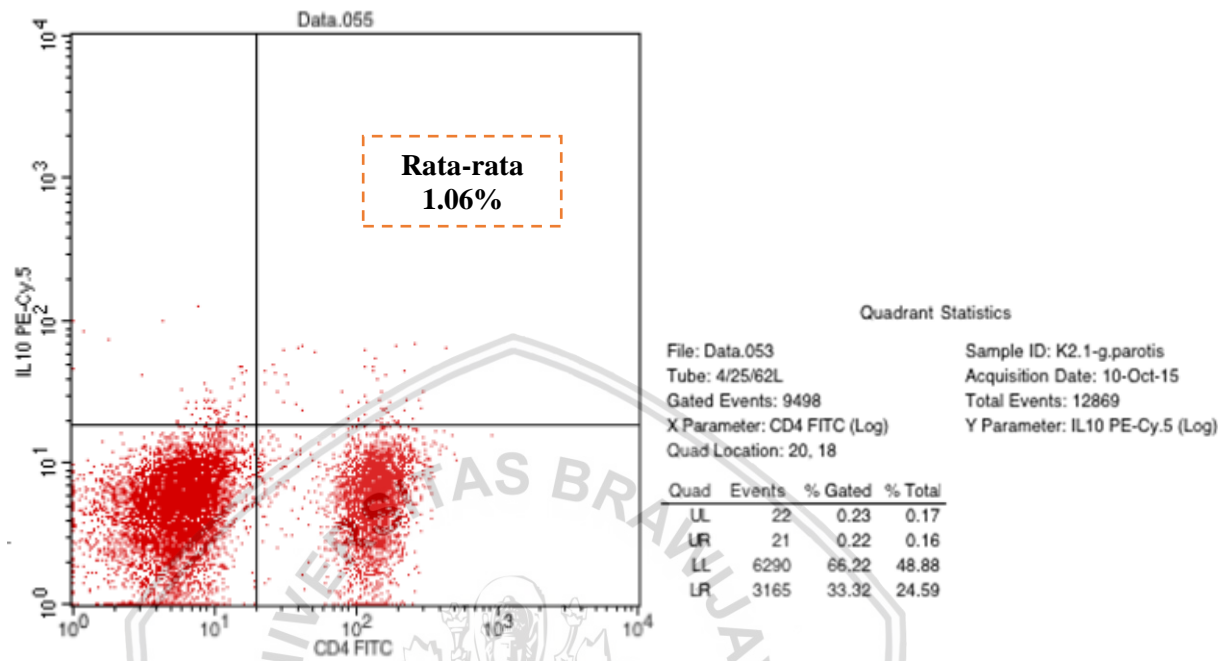
Quadrant Statistics

File: Data.049
Tube: 4/25/62L
Gated Events: 9855
X Parameter: CD4 FITC (Log)
Quad Location: 20, 18

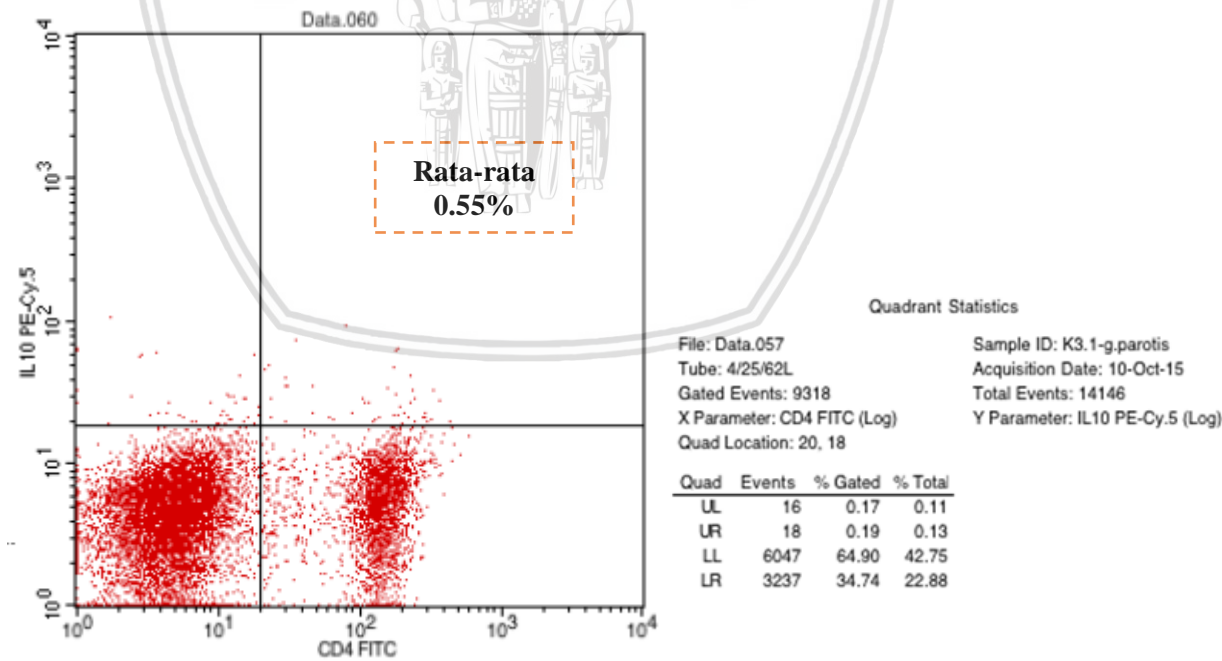
Sample ID: K1.1-g.parotis
Acquisition Date: 10-Oct-15
Total Events: 12770
Y Parameter: IL10 PE-Cy.5 (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	27	0.27	0.21
UR	36	0.37	0.28
LL	7565	76.76	59.24
LR	2227	22.60	17.44

d. Dosis 0,25 ml



e. Dosis 0,5 ml



Lampiran 10. Hasil Analisa Statistika

Uji ANOVA dan *Tukey TNF- α*

Descriptives

TNF α

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol (+) [1]	4	.5675	.20123	.10061	.2473	.8877
Kontrol (-) [2]	4	2.6675	.28159	.14079	2.2194	3.1156
Perlakuan 1 [3]	4	1.1000	.22166	.11083	.7473	1.4527
Perlakuan 2 [4]	4	1.4550	.26789	.13395	1.0287	1.8813
Perlakuan 3 [5]	4	2.0725	.22157	.11078	1.7199	2.4251
Total	20	1.5725	.78317	.17512	1.2060	1.9390

Descriptives

TNF α

	Minimum	Maximum
Kontrol (+) [1]	.38	.84
Kontrol (-) [2]	2.30	2.96
Perlakuan 1 [3]	.87	1.36
Perlakuan 2 [4]	1.11	1.76
Perlakuan 3 [5]	1.75	2.24
Total	.38	2.96

Test of Homogeneity of Variances

TNF α

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.125	4	15	.971

ANOVA

TNF α

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10.784	4	2.696	46.521	.000
Within Groups	.869	15	.058		
Total	11.654	19			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: TNF α

Tukey HSD

		Mean	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Difference (I-J)			Lower Bound
1	2	-2.10000*	.17023	.000	-2.6257

	3	-.53250*	.17023	.046	-1.0582
	4	-.88750*	.17023	.001	-1.4132
	5	-1.50500*	.17023	.000	-2.0307
2	1	2.10000*	.17023	.000	1.5743
	3	1.56750*	.17023	.000	1.0418
	4	1.21250*	.17023	.000	.6868
	5	.59500*	.17023	.023	.0693
3	1	.53250*	.17023	.046	.0068
	2	-1.56750*	.17023	.000	-2.0932
	4	-.35500	.17023	.276	-.8807
	5	-.97250*	.17023	.000	-1.4982
4	1	.88750*	.17023	.001	.3618
	2	-1.21250*	.17023	.000	-1.7382
	3	.35500	.17023	.276	-.1707
	5	-.61750*	.17023	.018	-1.1432
5	1	1.50500*	.17023	.000	.9793
	2	-.59500*	.17023	.023	-1.1207
	3	.97250*	.17023	.000	.4468
	4	.61750*	.17023	.018	.0918

Multiple Comparisons

Dependent Variable: TNFa

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	95% Confidence Interval
		Upper Bound
1	2	-1.5743
	3	-.0068
	4	-.3618
	5	-.9793
2	1	2.6257
	3	2.0932
	4	1.7382
	5	1.1207
3	1	1.0582
	2	-1.0418
	4	.1707
	5	-.4468
4	1	1.4132
	2	-.6868
	3	.8807
	5	-.0918
5	1	2.0307
	2	-.0693
	3	1.4982
	4	1.1432

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

TNFa

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
1	4	.5675			
3	4		1.1000		
4	4		1.4550		
5	4			2.0725	
2	4				2.6675
Sig.		1.000	.276	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		TNFa
N		20
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	1.5725
	Std. Deviation	.78317
Most Extreme Differences	Absolute	.104
	Positive	.083
	Negative	-.104
Test Statistic		.104
Asymp. Sig. (2-tailed)		.200 ^{c,d}

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

d. This is a lower bound of the true significance.

Uji ANOVA dan Tukey IL-10

Descriptives

IL-10

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol (+) [1]	4	2.0775	.23128	.11564	1.7095	2.4455
Kontrol (-) [2]	4	.3375	.15650	.07825	.0885	.5865
Perlakuan 1 [3]	4	1.5950	.25684	.12842	1.1863	2.0037
Perlakuan 2 [4]	4	1.0650	.21299	.10650	.7261	1.4039
Perlakuan 3 [5]	4	.5500	.22256	.11128	.1959	.9041
Total	20	1.1250	.69003	.15430	.8021	1.4479

Descriptives

IL-10

	Minimum	Maximum
Kontrol (+) [1]	1.84	2.30
Kontrol (-) [2]	.21	.55
Perlakuan 1 [3]	1.37	1.89
Perlakuan 2 [4]	.81	1.26
Perlakuan 3 [5]	.32	.84
Total	.21	2.30

Test of Homogeneity of Variances

IL-10

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.928	4	15	.474

ANOVA

IL-10

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8.330	4	2.083	43.595	.000
Within Groups	.717	15	.048		
Total	9.047	19			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: IL-10

Tukey HSD

		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval Lower Bound
(I) Perlakuan	(J) Perlakuan				
1	2	1.74000*	.15455	.000	1.2628
	3	.48250*	.15455	.047	.0053
	4	1.01250*	.15455	.000	.5353
	5	1.52750*	.15455	.000	1.0503
2	1	-1.74000*	.15455	.000	-2.2172
	3	-1.25750*	.15455	.000	-1.7347
	4	-.72750*	.15455	.002	-1.2047
	5	-.21250	.15455	.652	-.6897
3	1	-.48250*	.15455	.047	-.9597
	2	1.25750*	.15455	.000	.7803
	4	.53000*	.15455	.026	.0528
	5	1.04500*	.15455	.000	.5678
4	1	-1.01250*	.15455	.000	-1.4897
	2	.72750*	.15455	.002	.2503
	3	-.53000*	.15455	.026	-1.0072

	5	.51500*	.15455	.032	.0378
5	1	-1.52750*	.15455	.000	-2.0047
	2	.21250	.15455	.652	-.2647
	3	-1.04500*	.15455	.000	-1.5222
	4	-.51500*	.15455	.032	-.9922

Multiple Comparisons

Dependent Variable: IL-10

Tukey HSD

		95% Confidence Interval
(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Upper Bound
1	2	2.2172
	3	.9597
	4	1.4897
	5	2.0047
2	1	-1.2628
	3	-.7803
	4	-.2503
	5	.2647
3	1	-.0053
	2	1.7347
	4	1.0072
	5	1.5222
4	1	-.5353
	2	1.2047
	3	-.0528
	5	.9922
5	1	-1.0503
	2	.6897
	3	-.5678
	4	-.0378

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

IL-10

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
2	4	.3375			
5	4	.5500			
4	4		1.0650		
3	4			1.5950	
1	4				2.0775
Sig.		.652	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		IL-10
N		20
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	1.1250
	Std. Deviation	.69003
Most Extreme Differences	Absolute	.131
	Positive	.131
	Negative	-.110
Test Statistic		.131
Asymp. Sig. (2-tailed)		.200 ^{c,d}

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

d. This is a lower bound of the true significance.

